

**DIE EXPRESSION VON C-MYC WÄHREND
DER AUSWANDERUNG VON PRÄMYOBLASTEN
IN DIE GLIEDMAßENANLAGE DES VOGELEMBRYOS
UND DIE VALIDIERUNG VON KONSTRUKTEN
ZUR FUNKTIONSANALYSE DURCH RNAI**

INES KATRIN HELLWIG



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus „Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen“

Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

und

„Institut für Anatomie und Zellbiologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
i. Brsg.“

Betreuerin: Prof. Dr. Beate Brand-Saberi

***Die Expression von c-myc während der Auswanderung von
Prämyoblasten in die Gliedmaßenanlage des Vogelembryos
und die Validierung von Konstrukten zur Funktionsanalyse
durch RNAi***

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Ines Katrin Hellwig
Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer

Gutachter/in: Frau Prof. Dr. B. Brand-Saberi
Herr Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der Disputation: 8. Juni 2009

*Diese Arbeit widme ich meinen Eltern aus Dankbarkeit für ihre endlose
Geduld und Unterstützung.*

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Freiburg, 25.03.2009

Ines Hellwig

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung	1
1.1 Myc.....	1
1.1.1 Genetische Analyse von <i>c-myc</i>	1
1.1.2 Hintergrund zur Proteinfunktion von c-Myc	2
1.1.2.1 Struktur und funktionelle Domänen.....	2
1.1.2.2 Die Wirkweise von c-Myc als Transkriptionsfaktor	3
1.1.3. Die Funktion von c-Myc im Zellzyklus, Zellproliferation und Zelldifferenzierung	5
1.2 Somitogenese und Myogenese im Vogelembryo.....	9
1.3 Das Prinzip der RNA Interferenz	11
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Geräte.....	14
2.1.2 Laborbedarf.....	15
2.1.3 Lösungen und Chemikalien	17
2.1.4 Enzyme	28
2.1.5 Sonden.....	29
2.1.6 Plasmide.....	29
2.2 Tiere.....	30
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.3.1 Plasmide zum Knockdown	30
2.3.2 Konstruktion der shRNA Moleküle.....	31
2.3.3 Annealing	32
2.3.4 Ligation der DNA Fragmente	33
2.3.5 Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	34
2.3.6 Anlegen der Bakterienkultur.....	35
2.3.7 Lagerung einer Stammlösung transformierter Zellen	35
2.3.8 Minipräparation der Plasmide.....	36
2.3.9 Enzymatischer Restriktionsverdau.....	36
2.3.10 DNA Agarose Gelelektrophorese	37
2.3.11 Midipräparation der Plasmide	39
2.3.12 Ermittlung der Plasmidkonzentration	40
2.4 In Ovo Elektroporation.....	41
2.4.1 Vorbereitung	41
2.4.2 Operationstechnik	42
2.4.3 Dokumentation.....	43
2.5 Methoden zur Auswertung der Embryonen	44

2.5.1	Whole-mount In-Situ Hybridisierung	44
2.5.1.1	Herstellung der RNA-Sonde	45
2.5.1.2	Whole-mount In-Situ Hybridisierung nach Patel.....	47
2.5.1.3	Whole-mount In-Situ Hybridisierung nach Birchmeier.....	50
2.5.1.4	Whole-mount In-Situ Hybridisierung von Kontrollembryonen	52
2.5.2	Vibratonschnitte.....	52
2.5.3	Fluoreszenz-Immunhistochemie	53
2.5.4	Fotodokumentation	54
3.	Ergebnisse	55
3.1	Das Expressionsmuster von <i>c-myc</i> in den Somiten auf Höhe der Hinterextremitäten sowie in den Gliedmaßenanlagen.....	55
3.1.1	Das Expressionsmuster im Stadium HH 17	55
3.1.2	Das Expressionsmuster im Stadium HH 18.....	56
3.1.3	Das Expressionsmuster in den Stadien HH 20 und HH 21.....	56
3.1.4	Das Expressionsmuster in den Stadien HH 22 und HH 23.....	57
3.1.5	Das Expressionsmuster im Stadium HH 25	57
3.1.6	Das Expressionsmuster in den Stadien HH 27 bis HH 30	58
3.2	Knockdownexperimente von <i>c-myc</i>	68
3.2.1	Nachweis des Knockdowns im Hühnerembryo mit Hilfe von In-Situ Hybridisierung	68
3.2.2	Untersuchung des Migrationsverhaltens der mit shRNA-Konstrukten transfizierten Zellen im Hühnerembryo.....	72
3.2.3	Untersuchung der Auswirkungen des Knockdowns auf Pax3	76
4.	Diskussion	77
4.1	Das Expressionsmuster von <i>c-myc</i> in den Somiten auf Höhe der Hinterextremitäten sowie in den Gliedmaßenanlagen.....	77
4.2	Knockdownnachweis von <i>c-myc</i> im Hühnerembryo.....	81
4.3	Das Migrationsverhalten der mit shRNA-Konstrukten transfizierten Zellen ...	82
5.	Zusammenfassung / Summary	87
6.	Literaturverzeichnis.....	89
7.	Anhang	95
7.1	Stadienbestimmung der Embryonen nach Hamburger und Hamilton.....	95
7.2	Abbildungen der Vektoren	96
7.3	Abbildungsverzeichnis	99
7.4	Tabellenverzeichnis.....	101
8.	Danksagung	102

Abkürzungsverzeichnis

AER	Apical Ectodermal Ridge
AP-Puffer	Alkalische Phosphatase-Puffer
AS	Aminosäure
AVL	Avian Leukemia Virus
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphate
bHLH-LZ	basic-Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper-Motiv
bp	Basenpaar
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CTD	C-Terminale Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DML	Dorsal Medial Lip
EB	Elution Buffer
E-Box	Enhancer-Box
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FGF	Fibroblast Growth Factor
HH	Hamburger und Hamilton
kb	kilobasen
kDa	kiloDalton
LB	Luria Bertani
Max	Myc-associated factor-X

MB	Myc-Box
miRNA	micro RNA
MRF	Myogenic Regulatory Factor
myc	Myelocytomatosis
NBT	4-Nitro Blue Tetrazolium Chloride
NTS	Nukleäres Translokations-Signal
PBI	Purification Buffer I
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBT	PBS mit Triton X-100/Tween-20
PE-Puffer	Waschpuffer
PFA	Paraformaldehyd
pRB	Retinoblastomprotein
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNAi	RNA Interferenz
RNMT	RNA-Methyltransferase
RP	Restriktionspunkt
SDF	Stromal Derived Factor
SF/HGF	Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
SSC	Standard Sodium Citrat
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris Acetat EDTA
TBST	Tris Buffered Saline mit Triton X-100

TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TRBP	HIV Transactivating Response Binding Protein
TRRAP	Transformation/Transcription domain-associated protein
VLL	Ventral Lateral Lip

1. Einleitung

1.1 Myc

1.1.1 Genetische Analyse von *c-myc*

Das *myc*-Onkogen wurde ursprünglich von Sheiness & Bishop als das virale Onkogen *v-myc* des MC 29 Stammes des „avian leukemia virus (AVL)“ identifiziert (Sheiness und Bishop, 1979). Dieses aviäre Retrovirus verursacht neben Sarkomen, Leber- und Nierentumoren die Myelocytomatose in Vögeln und trägt daher seinen Namen. 1982 wurde *c-myc* als das zelluläre Homolog von *v-myc* isoliert (Vennstrom et al., 1982). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird mit *myc* das Gen und mit Myc das Protein bezeichnet.

Das *c-myc*-Gen gehört zu einer Genfamilie, deren Mitglieder zellspezifisch exprimiert werden und die sehr wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden ist. Am besten charakterisiert sind neben *c-myc*, *N-myc* und *L-myc*. Daneben wurden noch *S-myc* und *B-myc*, die nur in Nagern vorkommen, beschrieben. Die einzelnen evolutionär hoch konservierten Familienmitglieder können sich funktionell teilweise ersetzen, werden jedoch in unterschiedlichen Geweben und Organen und zu unterschiedlichen Zeiten in der Entwicklung exprimiert (DePinho et al., 1991; Morgenbesser und DePinho, 1994; Bull et al., 2001). Die Proteine von *c-myc*, *N-myc* und *L-myc* zeigen im Gegensatz zu den Proteinen von *S-myc* und *B-myc* transformierende Aktivität. S-Myc und B-Myc wirken sowohl auf die Zellproliferation als auch auf die Transformation von Zellen inhibitorisch.

Das *c-myc*-Gen, welches für den Transkriptionsfaktor c-Myc codiert, liegt im menschlichen Genom auf dem Chromosom 8, Abschnitt q24. Es besteht aus 3 Exons (Exon 1, Exon 2 und Exon 3) und beinhaltet 4 Promotoren (P0-P3), von denen P2 der am häufigsten genutzte darstellt (75-90% der Transkripte) (vgl. Abb. 1). Dies erklärt sich durch seine optimale TATA-Box TATAAAAG und seine 2 Initiatorelemente zur Bindung der Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIID/TFIIA (Wierstra und Alves, 2008). Bei einer Translation vom Startcodon AUG im Exon 2

ausgehend, entsteht ein Protein mit einer Größe von 64 kDa (439 Aminosäuren), das sogenannte Myc 2-Protein. Beginnt die Translation an dem Startcodon CUG am Ende von Exon 1, entsteht ein 67 kDa großes Protein, das Myc 1-Protein, welches am N-Terminus 14 AS länger ist als Myc 2. Die dritte und kleinste Isoform, Myc S, hat eine Größe von 45 kDa und wird an zwei internen AUGs initiiert. Die hauptsächlich exprimierte Isoform stellt Myc 2 dar (Henriksson und Lüscher, 1996). Die Expression wird sehr früh in der G1-Phase des Zellzyklus durch Mitogene induziert. Nach diesem starken Konzentrationsanstieg in G1 kommt es schnell wieder zu einem Abfall der Konzentration, um dann über den restlichen Zellzyklus ein konstantes Level beizubehalten. Keine Expression findet in der G0-Phase statt (Wierstra und Alves, 2008).

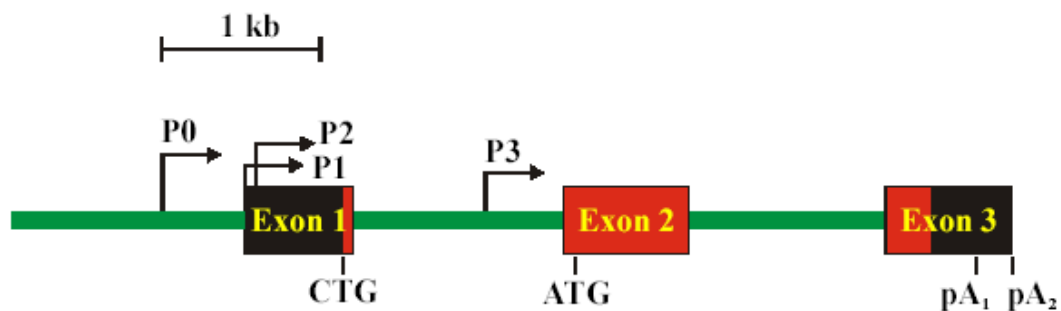


Abb. 1 Die Struktur des c-myc Gens

Der P2-Promotor führt zur Transkription der myc-mRNA (75-90% aller Transkripte), wobei die Exons 2 und 3 für das 64kd (vom ATG-Startcodon), bzw. das 67kb Protein (CTG-Startcodon) codieren. Die Polyadenylierungsstellen sind mit pA1 und pA2 bezeichnet.

1.1.2 Hintergrund zur Proteinfunktion von c-Myc

1.1.2.1 Struktur und funktionelle Domänen

Das c-Myc-Protein ist durch verschiedene Domänen charakterisiert (vgl. Abb. 2). Im N-Terminus befindet sich die Transaktivierungsdomäne (TAD), die bei der Transaktivierung von Zielgenen eine wichtige Rolle spielt. Diese Domäne beinhaltet verschiedene konservierte N-terminale Domänen, die als Myc-Boxen bezeichnet werden (z. B. MB I und MB II) und nur in der *myc*-Genfamilie zu finden sind. Besonders die Myc-Box II ist hoch konserviert und stellt die wichtigste Komponente der Transaktivierungsdomäne dar. Sie ist notwendig für die Bindung von vielen

Kofaktoren, für die Transaktivierung und die Repression von vielen Zielgenen von Myc und für die effiziente Ausführung des biologischen Effektes von Myc (Cowling und Cole, 2006). Die C-terminale Region beinhaltet ein Dimerisationsmotiv, das sogenannte „basic-Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper-Motiv (bHLH LZ)“. Über die basische Region (b) bindet c-Myc spezifisch an Stellen der DNA mit der Basenfolge 5'-CACGTG, die als „Enhancer Box“ (E-Box) bezeichnet wird. Über das HLH LZ-Motiv ist eine Dimerisierung mit dem Interaktionspartner Max möglich, was für die biologischen Funktionen von c-Myc notwendig ist. Zusätzlich trägt das Myc-Protein ein nukleäres Translokations-Signal (NTS), welches die Lokalisation in den Zellkern dirigiert (Henriksson und Lüscher, 1996).

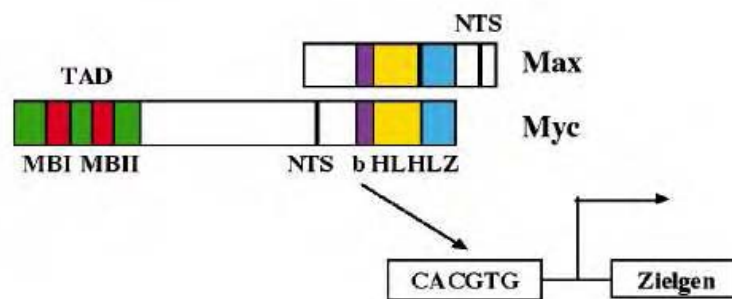


Abb. 2 Das Myc-Protein (Abbildung nach Dang, 1999)

Abgebildet sind hier die einzelnen Domänen von c-Myc und Mad. c-Myc interagiert mit seinem Dimerisierungspartner Max und bindet an spezifische DNA-Sequenzen im Promotor von Zielgenen. MB I/MB II, Myc-Box I/II; NTS, Kerntranslokationssignal; TAD, Transaktivierungsdomäne; bHLHZip; basic region/helix-loop-helix/leucine-zipper.

1.1.2.2 Die Wirkweise von c-Myc als Transkriptionsfaktor

Für die biologischen Funktionen von c-Myc ist eine Dimerisierung mit dem Myc-associated factor-X (Max), ebenso ein bHLH LZ-Protein, essentiell. Das Max-Protein bildet über die HLH LZ-Domäne Heterodimere mit c-, N- und L-Myc, kann aber auch, im Gegensatz zu c-Myc, Homodimere bilden. Dimere aus Max und einem der Myc-Partner funktionieren als transkriptionelle Regulatoren, die Proliferation, Wachstum und Apoptose induzieren, während die Bindung von Max an andere Mitglieder des Netzwerkes, wie z.B. die Mad-Proteine, eine antagonistische Wirkung, wie Arretierung und Differenzierung, hat (Henriksson und Lüscher, 1996).

Wie oben bereits erwähnt kodiert *c-myc* für einen Transkriptionsfaktor, der eine große Anzahl von spezifischen Zielgenen reguliert. Die verschiedenen Mechanismen der Regulation sind im folgenden Modell aufgeführt:

a) Transkriptionsinitiation durch Myc/Max mit Hilfe des Histonacetyltransferasekomplexes

Das Myc-Max-Heterodimer bindet an die E-Box-Sequenz unter Assoziation von Myc mit dem Histonacetyltransferasekomplex, der TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein) beinhaltet. Dies führt zu einer Aktivierung von GCN5 oder TIP 60 und somit zur gezielten Acetylierung von Histon 3 oder Histon 4 an einzelnen Nukleosomen (McMahon et al., 2000). Die Rekrutierung von TRRAP und die damit verbundene Acetylierungsaktivität ist zusätzlich noch assoziiert mit der Stimulierung der Transkription der RNA-Polymerasen I und III (Grandori et al., 2005). Die Histonacetylierung führt zu einer Strukturveränderung des Chromatins und erhöht somit die Zugänglichkeit der Promotorregion für Aktivatoren des Gens (Chromatin-Remodelling) (Bouchard et al., 2001).

b) Regulation der Transkriptionselongation

Hierbei greift Myc in Kombination mit Max in den Zyklus der RNA-Polymerase II ein. Die RNA-Polymerase II bindet in einem hypophosphorylierten Zustand ihrer C-terminalen Domäne (CTD) an den Promotor. Während der Transkription werden die Ser5 der CTD mit Hilfe des Transkriptionsfaktors TFIIF phosphoryliert, was zu einem Stoppen der Polymerase führt. Durch eine Phosphorylierung der Ser2 aufgrund eines Elongationsfaktorkomplexes wird die Elongation stimuliert. Während und nach der Termination der Transkription kommt es zu einer Dephosphorylierung der CTD. Myc kann den Elongationsfaktorkomplex rekrutieren und somit eine Phosphorylierung der Ser2 initiieren. Hierdurch wird die gestoppte Transkription fortgesetzt (Cole und Cowling, 2008)

c) Transkriptionsunabhängige Regulation

Myc kann zu einem Anstieg der Proteinmenge führen, indem es die Translation von spezifischer mRNA reguliert.

Während der ersten Schritte der Transkription findet das Capping und die Methylierung der mRNA statt. TFIIF führt zu einer Phosphorylierung der RNA-Polymerase II, was wiederum zu einer Aktivierung der cap RNA Methyltransferase (RNMT) und somit zur Capmethylierung führt. Dies ist notwendig, um eine Bindung von Translationsfaktoren gewährleisten zu können. Fehlt das Cap oder seine Methylierung, so kommt es zu einer Degradierung der mRNA. Myc kann die Methylierung des Caps initiieren, indem es TFIIF bindet (Cole und Cowling, 2008).

d) Myc/Max-vermittelte Repression von Genen

Myc-Max-Heterodimere binden an sogenannte Initiatorelemente im Promotor der Zielgene und verhindern somit die Bindung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren wie z.B. Miz-1, der als aktivierender Transkriptionsfaktor die Expression des p15^{INK4b}-Gens induziert. Myc und Max bilden einen Komplex mit Miz-1 und inhibieren so die Aktivierung des p15^{INK4b}-Gens (Staller et al., 2001). Ebenfalls beschrieben ist eine In-unabhängige Repression durch Myc. Hierbei bindet Myc direkt an Transkriptionsfaktoren in den E-Boxen eines Promotors und verhindert so die Aktivierung des betreffenden Gens.

1.1.3. Die Funktion von c-Myc im Zellzyklus, Zellproliferation und Zelldifferenzierung

Eine der Hauptfunktionen von Myc ist es, die Progression durch den Zellzyklus zu fördern. Während in ruhenden Zellen fast keine *myc*-Expression nachweisbar ist, führt eine Serum- oder Mitogenstimulation zu einem raschen Anstieg der *myc*-RNA und des Myc-Proteins. Außerdem tritt die Zelle in die G1-Phase ein. Danach verringert sich die Menge von Myc auf ein niedriges, aber gleich bleibendes Niveau (Amati, 2001). Wegen dieser äußerst hoch kontrollierten Expression und der schnellen Anpassung an das extrazelluläre Milieu wird Myc auch als der „intrazelluläre Sensor des extrazellulären Milieus“ bezeichnet. *Myc*-knock-out-Mäuse sterben während der frühen Embryonalentwicklung durch eine verringerte

primitive Hämatopoese. Jedoch scheint *c-myc* während der Embryogenese durch *N-myc* ersetzbar zu sein, während *L-myc* keine Rolle in der Embryogenese spielt.

Myc ^{-/-} tierische Fibroblasten weisen reduzierte Raten der Zellproliferation und Defekte in der globalen mRNA- und Proteinsynthese auf (Mateyak et al., 1997). Viele direkte und indirekte Zielgene von *Myc* sind an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (vgl. Abb. 3). Sie beeinflussen die Regulation der Zell-Matrix-Interaktionen, die DNA-Synthese, sowie den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Coller et al., 2000; Schuhmacher et al., 2001; Fernandez et al., 2003). Dieser Übergang wird durch den sogenannten Restriktionspunkt (R) kontrolliert. Für die S-Phase ist ein bestimmter Satz von Genen notwendig, deren Expression vor allem von den Transkriptionsfaktoren der E2F Familie abhängt (Weinberg 1995). E2F bindet als Heterodimer mit seinem Interaktionspartner, der als DP-Protein bekannt ist, an die DNA und initiiert die Transkription wichtiger Gene für die S-Phase. Das Tumorsuppressorprotein pRb (Retinoblastomprotein) und seine verwandten Proteine p107 und p130 binden E2F am Restriktionspunkt und verhindern somit die Transaktivierung der Gene. Um den RP zu überwinden, muss nun das Tumorsuppressorprotein pRb durch Phosphorylierung inaktiviert werden. Dieser Vorgang wird durch die Cyclin/Cdk (Cyclin-abhängige Kinasen)-Komplexe Cyclin D/Cdk 4/6 und Cyclin E/Cdk 2 vermittelt (Sherr und Roberts, 1999). Deren Funktion wird durch die zwei CDK-Inhibitoren-Familien INK (p15, p16, p18, p19) und KIP (p21, p27, p57) negativ reguliert (Sherr und Roberts, 1995).

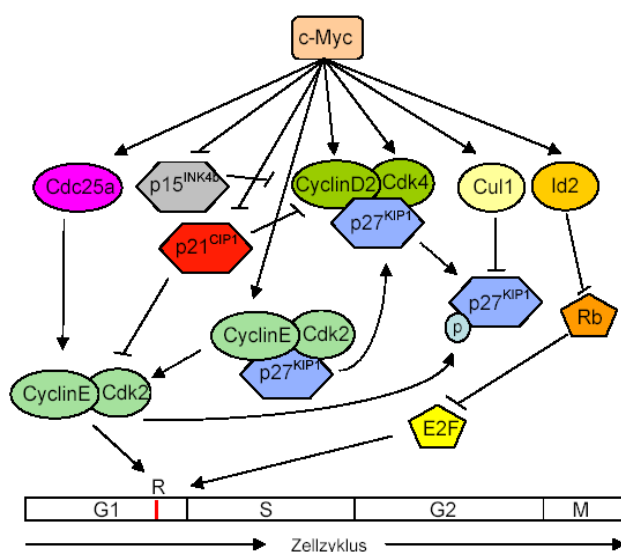


Abb. 3 Die Rolle von *Myc* in der Zellzyklus-Regulation

Die Kinasen Cdk4 und Cdk2 werden durch Assoziation mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen aktiviert. Die Inhibition erfolgt durch Proteine der INK-Familie (p15) oder der KIP-Familie (p21, p27). CyclinD/Cdk4 und CyclinE/Cdk2 phosphorylieren das Retinoblastomprotein (Rb). Die Rb-Phosphorylierung führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F. E2F wiederum induziert die Expression von Faktoren, die für die DNASynthese benötigt werden.

Durch direkte Induktion der Zielgene Cdk 4 und Cyclin D2 durch Myc entsteht ein aktiver Komplex (Cyclin D2/Cdk 4). Die Substrate dieses Komplexes sind die sogenannten „Pocket-Proteine“, zu denen auch pRb gehört. Außerdem sequestriert er den Cyclin/Cdk-Inhibitor (CKI) p27, der an den inaktiven Cyclin E/Cdk 2-Komplex gebunden ist. Durch die Sequestrierung, aber auch durch die Aktivierung der Phosphatase Cdc25a durch Myc, die dann zu einer Stimulation des Cyclin E/Cdk2-Komplexes führt, indem sie inhibitorische Phosphate von CDKs entfernt, wird dieser Komplex aktiv. Dies hat die Inaktivierung des CKI p27 und wohl auch p21 und p57 durch Phosphorylierung zur Folge. Durch einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, der Cul1, ein weiteres Zielgen von Myc, enthält, wird das phosphorylierte p27 schließlich erkannt und abgebaut (Coller et al., 2000; Bouchard et al., 2001). Die Inaktivierung von p27 ist auch durch direkte transkriptionelle Reprimierung durch c-Myc selbst beschrieben worden (Gartel et al., 2001). Der aktive Cyclin E/Cdk 2-Komplex ist für den Eintritt in die S-Phase notwendig. Ein weiterer, wichtiger Schritt bei der Inhibition des pRb ist die Induktion der Expression des Id2-Gens durch Myc. Dieses kodiert für ein HLH-Protein, welches die Funktion von pRb inhibiert (Lasorella et al., 2000). Myc reprimiert die Expression des Cyclin/Cdk-Inhibitor p15, der den Cyclin D/Cdk 4/6-Komplex inaktiviert, sowie die Expression von p21, welches Cyclin E/Cdk 2 inaktiviert. P21 wird durch das Tumorsuppressorprotein p53 als Teil eines antiproliferativen Programms hoch reguliert (Sherr und Roberts, 1999).

Zusammengefasst ist das Ergebnis dieser Myc-abhängigen Regulationsschritte die Aktivierung der Cyclin/Cdk-Komplexe, sowie die Inaktivierung des Retinoblastomaproteins, wodurch E2F als Heterodimer mit dem DP-Protein an die DNA binden und die Transkription wichtiger S-Phase-Gene initiieren kann. Der Übergang von der G1- in die S-Phase bei der Zellzyklusprogression stellt einen kritischen Punkt in der Tumorentstehung dar. Hat die Zelle den Restriktionspunkt überschritten, durchläuft sie den Zellzyklus auch unter limitierenden Bedingungen. Myc kann auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren den Restriktionspunkt überwinden und somit die S-Phase induzieren. Dies erfolgt über den oben genannten Weg, aber auch die Aktivierung des Zellwachstums stellt hierbei einen wichtigen Faktor dar.

Zellwachstum ist definiert als die Zunahme von Zellmasse bzw. -volumen. Bevor sich eine Zelle teilen kann, muss sie eine bestimmte Größe erreicht haben, damit sie genügend Masse an ihre Tochterzellen weitergeben kann. Zellwachstum und Proliferation sind also eng miteinander gekoppelt. Zwar ist der genaue Mechanismus der Regulation des Zellwachstums durch Myc noch ungenügend erforscht, jedoch wurden schon einige Zielgene von Myc identifiziert, die in der Proteinbiosynthese, in der Ribosomenbiogenese und im allgemeinen zellulären Stoffwechsel involviert sind (www.myccancergene.org). Als Beispiel ist die Aktivierung der RNA-Polymerase III über TFIIB, einen Polymerase III-spezifischen generellen Transkriptionsfaktor, durch Myc zu nennen. Damit unterstützt Myc die Bildung von t-RNA und 5S ribosomaler DNA und somit die Synthese neuer Proteine, welche für ein Wachstum der Zelle benötigt werden (Gomez-Roman et al., 2003). Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass Myc ein Wachstumsprogramm in Zellen induzieren kann, welches unabhängig von der Aktivierung des Zellzyklus abläuft. Zum Beispiel zeigen B-Zellen aus transgenen Mäusen, die *myc* unter der Kontrolle des Immunglobulin-Enhancers überexprimieren, in allen Stadien der B-Zellentwicklung ein größeres Wachstum als die Kontrollzellen (Iritani und Eisenman, 1999). Ebenso fördert die Expression eines exogenen *myc*-Gens in primären Leberzellen der Maus das Wachstum der Hepatozyten, ohne jedoch Proliferation oder Apoptose auszulösen (Kim et al., 2000).

Durch eine Überexpression von Myc wird die Differenzierung in vielen Zelllinien verhindert, da die Myc-Expression den Austritt aus dem Zellzyklus hemmt (Henriksson und Lüscher, 1996). Umgekehrt kommt es bei der Induktion der Zelldifferenzierung zu einer raschen Repression von *myc* und den Myc-regulierten Genen, da Mad-Proteine aktiviert werden. Hierbei handelt es sich, wie oben bereits beschrieben, ebenfalls um bHLH LZ-Proteine, die mit Myc um die Bindung mit Max konkurrieren (Ayer et al., 1993). Die Mad/Max-Komplexe binden an CACGTG-Konsensussequenzen (E-Box) und reprimieren die Transkription, indem sie Histondeacetylasen aktivieren.

1.2 Somitogenese und Myogenese im Vogelembryo

Da die Embryonalentwicklung des Vogels ein sehr komplexes Themengebiet darstellt, werden hier nur zwei Abschnitte, die Somitogenese sowie die Myogenese in der Extremität abgehandelt. Dies soll in vereinfachter Form geschehen.

Das zunächst einheitliche Mesoderm gliedert sich in das axiale (Chorda dorsalis), paraxiale, intermediäre und laterale Mesoderm. Unter Einfluss des bHLH Transkriptionsfaktors Paraxis wird das paraxiale Mesoderm epithelialisiert. Daraufhin schnüren sich Somitenpaare zu beiden Seiten des Neuralrohres in cranio-kaudaler Richtung ab. Das heißt, kranial befinden sich schon Somiten, während kaudal die noch unsegmentierte Segmentplatte zu finden ist. Die Segmentierung wird durch eine Reihe von Signalmolekülen in der Segmentplatte gesteuert. Im Zentrum der Somiten befinden sich mesenchymale Zellen, das sogenannte Somitozöl, welches von Epithel umgeben ist. Der ventrale Abschnitt der Somiten verliert durch verringerte Expression von N-Cadherin seinen epithelialen Charakter und bildet zusammen mit dem Somitozöl ein Mesenchym, das Sklerotom.

Bedingt durch eine hohe Proliferationsrate der Vorläuferzellen im Dermomyotom, kommt es zu einer Ausbreitung dessen nach dorsomedial und ventrolateral. Auslöser für das starke Wachstum des frühen Myotoms und des Dermomyotoms ist die mediale Dermomyotomlippe (Yusuf und Brand-Saberi, 2006). Die Vorläuferzellen differenzieren sich, je nach Lage im Dermomyotom, unterschiedlich. Manche migrieren von den Rändern nach ventral und bilden das Myotom (Gros et al., 2004), einige haben ihren Ursprung in der lateralen Dermomyotomlippe und bilden später Muskeln und Blutgefäße der Extremitätenanlage (Christ und Brand-Saberi, 2002), während Zellen aus dem dorsomedialen Bereich sowie dem zentralen Dermomyotom eine epithelio-mesenchymale Transition durchlaufen und später die Dermis bilden (Olivera-Martinez et al., 2002).

Das Myotom differenziert sich weiter zu dem ventrolateral gelegenen hypaxialen und dem dorsomedial gelegenen epaxialen Myotom. Aus dem hypaxialen Myotom entwickelt sich später die Interkostal- und Bauchmuskulatur, während aus dem epaxialen die autochthone Rückenmuskulatur hervorgeht.

Aus der lateralen Dermomyotomlippe migrieren auf zervikaler Ebene und auf Höhe der Extremitätenanlagen Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur, der Zunge und der

Endothelien der Blutgefäße. Diese Zellen exprimieren unter anderem *Pax3*, *Lbx1* und *CXCR4*. Durch Antikörperfärbung konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen entweder *Pax3* oder *Lbx1* exprimieren, während eine Expression von *CXCR4* nur in Pax3-positiven Zellen vorkommt (Yusuf und Brand-Saberi, 2006).

Durch die Expression von *Pax3* in der lateralen Dermomyotomlippe wird die Migration der Vorläuferzellen kontrolliert. Dies geschieht durch die Aktivierung von c-Met (Epstein et al., 1996). C-Met ist ein transmembranöser Tyrosinkinase-Rezeptor, der im Dermomyotom exprimiert wird. Sein Ligand ist Scatter factor/Hepatocyte Growth factor (SF/HGF). Dieser aktiviert die Migration und führt gleichzeitig durch eine Hemmung der Expression von *MyoD* zu einer verringerten Differenzierungsrate (Dietrich et al., 1999; Scaal et al., 1999).

Lbx1 wird ausschließlich in der lateralen Dermomyotomlippe und in den migrierenden Muskelvorläuferzellen exprimiert (Jagla et al., 1995). Seine Expression ist abhängig von Pax3 (Mennerich et al., 1998). Nach Aktivierung von muskelspezifischen Genen nimmt sie ab (Christ und Brand-Saberi, 2002). *Lbx1* ist für die Erkennung und Interpretation von Signalmolekülen verantwortlich und somit für die Migration der Zellen essentiell. *Lbx1*-mutierte Mäuse weisen eine veränderte Extremitätenmuskulatur auf. Während die Migration auf die Ventralseite der Extremität nur verändert ist, fehlt sie dorsal komplett (Brohmann et al., 2000).

Die Muskelvorläuferzellen, die aus der Extremitätenknospe in die entstehende Extremität migriert sind, differenzieren sich in eine dorsale und ventrale Vormuskelmasse (Christ et al., 1977). Durch das Wachstum der Extremität unterteilen die beiden sich zunächst in proximo-distaler Richtung weiter und teilen sich später so auf, dass deutlich ausgeprägte anatomische Muskelblasteme entstehen. Die entstandenen Vormuskelmassen in den Extremitäten bestehen jeweils aus zwei Schichten. Die oberflächliche, in der proliferierende Muskelvorläuferzellen *Pax3* und *Myf5* exprimieren und die darunterliegende, in der sich differenzierende Myoblasten *MyoD* exprimieren (Christ und Brand-Saberi, 2002). MyoD und Myf5 gehören zu den Myogenic Regulatory Factors (MRFs). Mit deren Aktivierung beginnt die Determination und die terminale Differenzierung der myogenen Vorläuferzellen, einhergehend mit der Bildung von Myoblasten, Myotuben und Muskelfasern. Das heißt, dass die embryonale Myogenese ein Produkt aus Proliferation und Differenzierung darstellt (Patel et al., 2002). Eine erhöht Proliferationsrate führt zu

einer Stimulation des Muskelwachstums und somit zu einer Vergrößerung der Muskeln.

1.3 Das Prinzip der RNA Interferenz

Unter RNA Interferenz (RNAi) versteht man einen natürlichen Mechanismus, der zuerst im Fadenwurm *C. elegans* und später auch in anderen eukaryotischen Organismen entdeckt wurde. Als Reaktion auf dsRNA (doppelsträngige RNA), die z.B. als Folge einer Replikation von Viren auftritt, kommt es zu einer sequenzspezifischen Degradation der komplementären zellulären mRNA (Fire et al., 1998) oder zu einer Translationsrepression. Für die Entdeckung der dsRNA als entscheidenden Faktor im RNAi-Signalweg wurden Andrew Z. Fire und Craig C. Mello im Jahr 2006 der Nobelpreis für Medizin oder Physiologie verliehen.

Als Reaktion auf die in die Zelle eingebrachte dsRNA wird eine Typ-III-Ribonuklease mit RNase III-Aktivität, auch als Dicer bezeichnet, aktiviert. Diese spaltet die dsRNA in 21-23 Basenpaar-lange doppelsträngige RNA-Fragmente, die siRNAs (short interfering RNA) (Grishok et al., 2001). Diese bilden anschließend mit der Endonuklease Dicer, einem Ago Protein und dem TRBP (HIV transactivating response binding protein) den sogenannten RISC (RNA-induced silencing complex) (Hammond et al., 2000; Hammond et al., 2001; Peters und Meister, 2007). Dieser Komplex schneidet und entfernt einen Strang der siRNA und dirigiert den verbleibenden Strang schließlich zu den komplementären mRNA-Molekülen des Pathogens. Bei einer vollständig komplementären Bindung mit der mRNA kommt es zu deren Degradation (vgl. Abb. 4). Ist die Bindung nicht vollständig komplementär, so wird lediglich eine Translationsrepression induziert (Hannon, 2002; Plasterk, 2002; Doench et al., 2003).

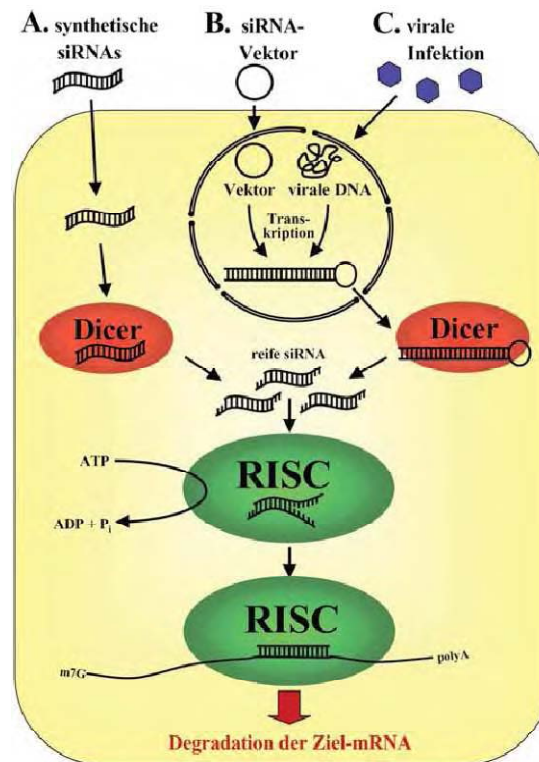


Abb. 4 Strategien zur RNA-Interferenztechnik (nach Eggert und Fischer, 2003)

A. Synthetische siRNA-Duplexe können direkt in Zellen transfiziert werden, in denen sie über die zelluläre RNAi-Maschinerie die RNA-Degradation induzieren.

B. Vektorcodierte siRNAs werden als haarnadelförmige Vorläufer im Zellkern gebildet und im Zytoplasma von Dicer zur siRNA prozessiert.

C. siRNAs können ebenfalls über Viren in der Zelle eingebracht werden. Als Bestandteil des viralen Genoms werden im Zellkern haarnadelförmige Vorläufer transkribiert, die wie unter B beschrieben im Zytoplasma zur siRNA prozessiert werden.

Als regulierende RNA kann neben der siRNA auch die miRNA (micro RNA) wirken, die sich nicht in ihrer Funktion, sondern nur in ihrer Herkunft unterscheidet. Während die siRNA aus exogener dsRNA entsteht, ist die miRNA endogenen Ursprungs, d.h. sie wird von der Zelle selbst mit Hilfe einer RNA-Polymerase II transkribiert (Schwarz und Zamore, 2002). Das Transkript ist die sogenannte pri-miRNA, aus dem durch eine Endonuklease III, Drosha, die pre-miRNA, geschnitten wird (Lee et al., 2003). Dieses wird mit Exportin 5 ins Zytoplasma transportiert und mit Dicer zu einer 21 Basenpaar-langen dsRNA geschnitten (Yi et al., 2003). Der restliche Signalweg entspricht dem einer siRNA (Schwarz und Zamore, 2002; Doench et al., 2003).

Der Prozess der RNA Interferenz hat sich zu einem bedeutenden molekularbiologischen Werkzeug manifestiert. Mit Hilfe von synthetischen siRNA-

Duplizes, siRNA Vektoren und viraler DNA, die in Zellen eingebracht werden, kann ein gezielter Knockdown von bestimmten Genen induziert werden. Dieser Knockdown macht eine gezielte Funktionsanalyse von diesen Genen möglich (Tuschl, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wird ein Vektor verwendet, der eine shRNA (short hairpin RNA) und einen RNA-Polymerase III-Promotor beinhaltet.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Extremitätenentwicklung beim Vogelembryo ist Gegenstand sehr vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Bekannt sind z.B. Gene, die für die Ablösung von Prämyoblasten aus der Extremitätenknospe verantwortlich sind, Gene, die die Polarität der Gliedmaße gewährleisten oder Gene, die zu Apoptosevorgängen führen. Ungeklärt ist aber immer noch, wie die Auswanderung der Prämyoblasten in die Vogelextremität von statten geht. Handelt es sich hierbei um Zellmotilität oder Zellproliferation oder einer Mischung aus beidem?

Da *c-myc* ein sehr gut untersuchtes Gen, vor allem in Bezug auf die Zellproliferation ist, stellt es ein geeignetes Mittel zur Beantwortung dieser Frage dar. Zielsetzung dieser Arbeit ist es deshalb, ein Konstrukt zum Knockdown von *c-myc* zu finden, mit welchem in Folgearbeiten anhand einer verringerten Proliferationsrate näher auf diese Fragestellung eingegangen werden kann.

Der Knockdown von *c-myc* soll mit Hilfe der RNA Interferenz herbeigeführt werden. Als Grundlage für den Knockdown soll zunächst eine vergleichende Expressionsanalyse der *c-myc* mRNA mit der von *Pax3* und *Lbx1* durchgeführt werden, da eine bereits existierende Expressionsanalyse von Jaffredo et al. aus dem Jahr 1989 vor allem die Expression des c-Myc Proteins beschreibt. Außerdem liegen die Schwerpunkte deren Analyse weder auf den Somiten noch auf den Gliedmaßenanlagen, die jedoch für die Zielsetzung dieser Arbeit von größtem Interesse sind. Als Methode wird die Whole-mount In-Situ Hybridisierung angewendet, bei der die mRNA durch Antisense-RNA-Sonden markiert wird.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Firma
Aspiratorschlauch	Sigma
Autoklav	Astell
Axioskop	Zeiss
Bakterienhaube Herasafe	Heraeus Instruments
Begasungsbrutschrank	Heraeus Instruments
Digitalkamera DC300F/DFC320	Leica
Dissektions-Fluoreszenzmikroskop MZFL III	Leica
Dissektionsmikroskop MZ 75	Leica
Elektroporator TSS20 Ovodyne Elektroporator	Intracel
Geflügeleiinkubator	Ehret
Gelkammer	Paqlab
Hybridisierungssofen Shake 'N' Stack	Hybaid
Inkubator	Heraeus
Iridektomieschere	Aesculap
Micropipetten Puller P-97	Sutter Instruments
Pinzetten	Dumont
Pipettierhilfen	Eppendorf, Gilson

Scheren	Aesculap
Schüttelinkubator Inova 4230	New Brunswick Scientific
Schüttelplatte Titramax 101	Heidolph
Sieblöffel	Aesculap
Spannungsquelle PS 3002	Gibco
Stereomikroskop MZ6	Leica
Sterilisator	Astell
Thermocycler MyCycler	Biorad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tiefkühlgerät	Heraeus
UV Transiluminator	Raytest
Vibratom	Leica
Vortex	Jahnke Kunkel
Zentrifuge 5402	Eppendorf
Zentrifuge 541R	Eppendorf
Zentrifuge Mini Spin 14500	Eppendorf

2.1.2 Laborbedarf

Bezeichnung	Firma
Boveri-Schalen	Duran
Deckgläser	Langenbrinck
Durapore tape	Health care
Einmalhandschuhe	Hartmann

Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf
Glasgefäße	Schott
Glaskapillaren	Sutter Instruments
Kulturgläschen	Sterilin
Kulturschalen	Falcon
Midi Kits Nucleo Bond extra	Machery-Nagel
MinElute PCR Purification kit (250)	Qiagen
Miniprep Kits QIAprep	Qiagen
Objektträger	Langenbrinck
Petrischalen	Becton Dickinson, Falcon
Pipettenspitzen	Eppendorf
Plastiktransferpipetten Falcon	Becton Dickinson Labware
Sterile Kanülen	Braun
Tupfer	Hartmann
Wolframdrahtnadeln	
Zellkulturplatte 24 well plate	Corning Inc.

2.1.3 Lösungen und Chemikalien

Lösungen zur Konstruktion von Plasmiden

Annealing Puffer 10x

0,5M Tris HCL (Sigma)	1,0 ml
5,0M NaCl (Sigma)	1,0 ml
0,5M EDTA pH 8,0 (Promega)	0,1 ml
ddH ₂ O	2,9 ml

Die Komponenten wurden gemischt und bei 4°C gelagert.

Tris-EDTA-Puffer pH 8,0 (TE-Puffer)

10mM Tris HCl pH 8,0	49,9 ml
0,5M EDTA pH 8,0 (Promega)	0,1 ml

Tris Acetat EDTA Puffer (TAE) 50x

Tris base (Sigma)	242,0 g
Eisessig (Riedel-deHaën)	57,1 ml
0,5M EDTA pH 8,0 (Promega)	100,0 ml

Das Gemisch wurde mit DEPC-H₂O auf einen Liter aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

Luria-Bertani (LB) Medium

LB-Trockenkonzentrat (Fluka)	20,0 g
ddH ₂ O	1,0 l

Um einen pH-Wert von 7,2 zu bekommen, wurden der Lösung 3-4 ml 1N NaCl oder 1N HCl zugegeben. Anschließend wurde sie autoklaviert und bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung wurde Ampicillin (Sigma) ergänzt.

Antibiotika Stammlösung

Ampicillin Natriumsalz (Sigma)	2,0 g
ddH ₂ O	20,0 ml

Die Sterilisation der Lösung erfolgte durch Filtration, die Lagerung fand bei -20°C statt.

Chemikalien zur Konstruktion von Plasmiden

100bp Ladder (New England Biolabs)

1kb Ladder (New England Biolabs)

Agar-Agar (Roth)

Agarose (Sigma)

Ammoniumacetat (Sigma)

Ampicillin (Sigma)

Buffer H (Roche)

Dimethylformamid (Merck)

Dithiothreitol (Sigma)

EB-Puffer (im „MinElute PCR Purification kit (250)“ von Qiagen enthalten)

Ethanol (Riedel-deHaën)

Ethidiumbromid (Sigma)

Glycerol (Sigma)

Isopropanol (Fluka Riedel-de Haën)

LB-Agar (Invitrogen)

LB-Medium (Invitrogen)

Ligations Puffer (Promega)

Loading Dye (New England Biolabs)

NTP-Markierungsmix (Roche)

PBI-Puffer(im „MinElute PCR Purification kit (250)“ von Qiagen enthalten)

PE-Puffer (im „QIAprep® Spin Miniprep Kit (250)“ von Qiagen enthalten)

RNA-Loading Buffer (Roche)

RNase Inhibitor

T4 DNA-Ligase (Promega)

Lösungen zur In Ovo Elektroporation

Locke-Lösung

NaCl (Merck)	94,27 g
KCl (Merck)	12,06 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O (Roth)	15,81 g

Die Salze wurden in 1 l ddH₂O gelöst und 30 min bei 120°C und 1 bar autoklaviert. Anschließend wurde 1 Spatelspitze Penicillin G zugegeben und die Lösung bei 4 °C gelagert.

Chemikalien zur In Ovo Elektroporation

Fast Green Powder (Sigma)

Tusche (Pelikan)

Lösungen zur In-Situ Hybridisierung

Alle Stammlösungen für die In-Situ Hybridisierung wurden mit DEPC-H₂O hergestellt um die Freiheit von RNAsen zu gewährleisten.

DEPC (Diethyl Pyrocarbonat) H₂O

DEPC (Sigma)	0,1% (v/v)
--------------	------------

Nach der Zugabe von DEPC zu ddH₂O wurde die Lösung zunächst über Nacht bei 37°C inkubiert, bevor sie dann autoklaviert wurde.

PBS (Phosphate Buffered Saline) 10x

NaCl (Merck)	80,0 g
KCl (Merck)	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	14,4 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	2,4 g
DEPC-H ₂ O	800,0 ml

Nach Herstellung der Lösung wurde der pH-Wert mit Hilfe von 1N NaCl oder 1N HCl auf 7,4 adjustiert. Anschließend wurde das Volumen mit DEPC-H₂O auf 1000 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

PBT (PBS mit Triton X-100) 10x

0,1% Triton X-100	10,0 ml
-------------------	---------

PBS 1x	990,0 ml
--------	----------

Das Gemisch wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.

PBT (PBS mit Tween-20) 10x

0,15% Tween-20 (Sigma)	1,5 ml
------------------------	--------

PBS 1x	998,5 ml
--------	----------

Das Gemisch wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.

4% PFA (Paraformaldehyd) in PBS

Paraformaldehyd Puder (Merck)	2,0 g
-------------------------------	-------

Das Puder wurde zu 25 ml PBS gegeben und in einem Wasserbad bei 65°C für 2 h erwärmt. Anschließend wurde das Volumen mit PBS auf 50 ml ergänzt und die Lösung bei -20°C gelagert.

4% PFA in PBT

Paraformaldehyd Puder(Merck)	2,0 g
------------------------------	-------

Die Herstellung erfolgte wie bei 4% PFA in PBS, nur dass anstatt PBS PBT verwendet wurde.

SCC (Standard Sodium Citrat)

NaCl (Merck)	175,3 g
--------------	---------

Natrium Ziträt (Sigma)	88,2 g
DEPC-H ₂ O	800,0 ml

Nach Herstellung der Lösung wurde der pH-Wert mit Hilfe von 1N NaCl oder 1N HCl auf 7,0 (Patel) oder 5,0 (Birchmeier) adjustiert. Anschließend wurde das Volumen mit DEPC-H₂O auf 1000 ml aufgefüllt, die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

0,5M EDTA (Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid) pH 8,0

NaOH (Merck)	20,0 g
EDTA (Sigma)	186,1 g
DEPC-H ₂ O	800,0 ml

Die Lösung wurde für einige Stunden gerührt und bei Raumtemperatur gelagert.

10% CHAPS

CHAPS (Appllichem)	10%
--------------------	-----

Der Puder wurde in ddH₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

Hybridisierungspuffer nach Patel

Formamid (Merck)	250,0 ml
20x SSC	125,0 ml
10% CHAPS	25,0 ml
EDTA	5,0 ml

Triton X-100 (Sigma)	0,5 ml
Heparin (Sigma)	250,0 µl
tRNA (Roche, 250µg/ml)	10,0 ml
Blockierungsreagenz (Roche)	10,0 g

Nach Mischung der Stoffe wurde die Lösung zu einem Gesamtvolumen von 500 ml mit DEPC-H₂O aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Hybridisierungspuffer nach Birchmeier

Formamid (Merck)	250,0 ml
20x SSC, pH 5,0	32,5 ml
10% CHAPS	25,0 ml
EDTA	5,0 ml
Tween-20 (Sigma)	1,0 ml
Heparin (Sigma)	0,5 ml
tRNA (Roche, 50 mg/ml)	5,0 ml

Nach Mischung der Stoffe wurde die Lösung zu einem Gesamtvolumen von 500ml mit DEPC-H₂O aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

1M Tris-Puffer Stammlösung

Tris Base (Sigma)	121,1 g
DEPC-H ₂ O	800,0 ml

Die entstandene Lösung wurde mit 3-4 ml NaCl oder 1N HCl auf den gewünschten pH-Wert (pH 7,3; 8,0; 9,5) adjustiert. Anschließend wurde das Gesamtvolumen auf

1 l mit DEPC-H₂O ergänzt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

TBST (Tris-buffered Saline with Triton X-100) 10x

NaCl (Merck)	80,06 g
KCl (Sigma)	2,01 g
1M Tris, pH 7,5	30,28 g
Triton X-100	10,0 ml

Nach Mischung der Stoffe wurde das Gesamtvolumen mit DEPC-H₂O auf 1 l ergänzt und autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Waschlösung 1 nach Birchmeier

Formamid	25,0 ml
20x SSC, pH 5,0	5,0 ml
EDTA	0,5 ml
Tween-20	0,1 ml
20% SDS	2,5 ml

Der Ansatz wurde mit DEPC-H₂O auf 50 ml aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Waschlösung 2 nach Birchmeier

Formamid	25,0 ml
20x SSC, pH 5,0	3,25 ml
EDTA	0,5 ml

Tween-20	0,1 ml
----------	--------

20% SDS	2,5 ml
---------	--------

Der Ansatz wurde mit DEPC-H₂O auf 50 ml aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

MABT pH 7,5

Maleinsäure (Sigma)	5,8 g
---------------------	-------

NaCl (Merck)	7,3 g
--------------	-------

Tween-20 (Sigma)	0,75 ml
------------------	---------

ddH ₂ O	400,0 ml
--------------------	----------

Der Ansatz wurde mit ca. 4 g NaOH-Plättchen auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und im Anschluss daran mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 500 ml ergänzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

1M MgCl₂

MgCl ₂ x 6H ₂ O (Sigma)	203,3 g
---	---------

DEPC-H ₂ O	800,0 ml
-----------------------	----------

Nach Lösung des Pulvers wurde das Gesamtvolumen mit DEPC-H₂O auf 1 l ergänzt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

5M NaCl

NaCl (Merck)	292,2 g
--------------	---------

DEPC-H ₂ O	800,0 ml
-----------------------	----------

Nach Lösung des Pulvers wurde das Gesamtvolumen mit DEPC-H₂O auf 1 l ergänzt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

25% Triton X-100

Triton X-100 (Sigma)	12,5 g
----------------------	--------

Das Detergenz wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt und anschließend mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 50 ml ergänzt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

AP-Puffer (Alkalische Phosphatase Puffer)

25% Triton X-100	0,2 ml
1M Tris pH 9,5	5,0 ml
1M MgCl ₂	2,5 ml
5M NaCl	1,0 ml

Die Lösungen wurden gemischt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 ml ergänzt.

NTMT= AP-Puffer nach Birchmeier

Tween-20	75,0 µl
1M Tris pH 9,5	5,0 ml
1M MgCl ₂	2,5 ml
5M NaCl	1,0 ml

Die Lösungen wurden gemischt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 ml ergänzt.

Färbelösung nach Patel

4-Nitro blue tetrazolium chloride (NBT, Roche)	4,5 µl/ml
---	-----------

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphate (BCIP, Roche)	3,5 µl/ml
--	-----------

Die Farbstoffe wurden zu dem frisch hergestellten AP-Puffer gegeben und dunkel gelagert.

Färbelösung nach Birchmeier

4-Nitro blue tetrazolium chloride (NBT, Roche)	3,5 µl/ml
---	-----------

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphate (BCIP, Roche)	3,5 µl/ml
--	-----------

Die Farbstoffe wurden zu dem frisch hergestellten NTMT-Puffer gegeben und dunkel gelagert.

Proteinase K

Proteinase K (Boehringer)	20 µg/ml
---------------------------	----------

Das Pulver wurde in DEPC-H₂O gelöst und in 25 µl Aliquots aufgeteilt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Chemikalien zur In-Situ Hybridisierung

Anti-Dig-Antikörper (Roche)

Glutaraldehyd (Sigma)

H₂O₂ (Merck)

Lammserum (Gibco)

Maleinsäure (Sigma)

Methanol (Fluka Riedel-de Haën)

NTP-Labelingmix (Roche)

tRNA (Roche)

Chemikalien für Vibratomschnitte

Agarose (Sigma)

Aquatex (Merck)

Chemikalien für die Fluoreszenz-Immunhistochemie

Bovines Serumalbumin BSA (Sigma)

Rabbit-anti-EGFP (Torrey Pines Biolabs Inc.)

Cy2 goat-anti-rabbit-IgG (Dianova)

2.1.4 Enzyme

BamH1 (Roche)

DrdI (Roche)

ECO RI (Roche)

HindIII (Roche)

Proteinase K (Sigma)

PVU II (Roche)

RNA-Polymerase SP6 und T7 (Roche)

T4 DNA-Ligase (Promega)

2.1.5 Sonden

c-myc zur Verfügung gestellt von Dr. Marian Ros Lasierra,
Universität Cantabria, Spanien

Pax3

Lbx1

2.1.6 Plasmide

pSP64 (vgl. Abb. 5)

pDrive (Qiagen) (vgl. Abb. 6)

pGEM7Z

pEGFP-H1 (Ambion)

pEGFP-U6 (Ambion)

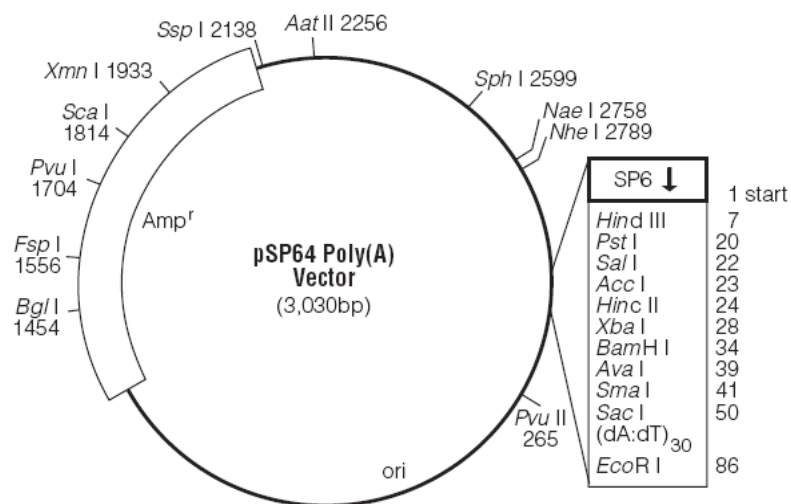


Abb. 5 pSP64 Poly(A) Vektor

Zur Konstruktion der Plasmide wurde zunächst ein geeigneter Vektor ausgewählt. Dieser kodiert für die Sequenz eines fluoreszierenden Markerproteins (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) und enthielt eine multiple Klonierungsstelle zur Insertion biologisch aktiver Sequenzen. Als nächstes wurde die Zielsequenz ermittelt und hergestellt. Hierfür wurden Sequenzen, die für shRNA (small hairpin RNA) kodieren, durch Verschmelzung von je zwei komplementären Oligonukleotiden konstruiert.

2.3.2 Konstruktion der shRNA Moleküle

Mit Hilfe des Programmes siRNA Target designer V 1.51 (Promega) konnten mögliche Lokalisationen von RNAi Zielsequenzen online ermittelt werden. An die Sequenz von *c-myc* wurde noch ein Stück angehängt, welches in der „*BBSRC ChickEST Database*“ herausgesucht wurde. Um unter den gefundenen Oligonukleotiden die besten auswählen zu können, wurden folgende Kriterien berücksichtigt: der Guanin- und Cytosin-Gehalt sollen unter 50% liegen, die erste Base soll Guanin, die dritte Adenin sein, außerdem sollen die letzten 5 Basen zu mindestens 60% aus Adenin oder Thymin bestehen.

Die dann noch in Frage kommenden siRNAs wurden der Nukleotid-BLAST Analyse (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) zugeführt, um Hybridisierungsmöglichkeiten an mRNAs anderer Gene, sogenannte „Off-Targets“, aufzudecken bzw. auszuschließen. Um ein komplettes shRNA Molekül zu konstruieren, mussten den ermittelten Bindungsstellen noch weitere Sequenzen zugeführt werden. Hierfür wurde eine Schleifensequenz (5'---TTCAAGAGA---3') zwischen den 1. Strang und den Komplementärstrang eingefügt. Außerdem wurden Sequenzen für Restriktionsenzyme eingebaut, um direktionales Klonen zu ermöglichen und zur Termination der Transkription der RNA-Polymerase III eine Poly-T-Sequenz (5'---GATCC-sense-loop-antisense-(T)₆-GAATTCA---3'). Im Anschluss daran wurde der komplementäre zweite Strang des shRNA Elementes mit Hilfe des Programmes ATG Wingene konstruiert, um das spätere Einfügen in einen DNA-Vektor zu ermöglichen.

Die ermittelten Zielsequenzen wurden bei Invitrogen (www.invitrogen.com) bestellt.

2.3.3 Annealing

Um aus den beiden komplementären Einzelsträngen einen Doppelstrang herzustellen, wurden die bestellten Oligonukleotide nach Erhalt zunächst mit 13000 rpm bei 4°C über 1 min zentrifugiert (Zentrifuge 5415R und 5402, Eppendorf) und anschließend nach Herstelleranleitung auf μM Konzentrationen mit TE-Puffer verdünnt und über 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran konnten die Oligonukleotide bei -20°C gelagert werden.

Im nächsten Schritt wurden die komplementären Oligonukleotide in äquimolarem Verhältnis in Annealing Puffer gelöst und in einem Thermocycler (MyCycler™, Biorad) zunächst für 5 min bei 90°C und dann für 5 min bei 85°C inkubiert. Hierdurch konnte die Linearisierung der Oligonukleotide gesichert werden, bei der die sekundäre Faltung der Stränge aufgehoben wurde. Die sich anschließende Hybridisierung erfolgte im Thermocycler bei einer Inkubationsdauer von 1 h bei 37°C. Im Anschluss daran wurde das sogenannte Insert im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

(Die Zielsequenzen sind hellgrün unterlegt. Gelb und rosa unterlegt sind Überhänge. Die Terminatoren der RNA-Polymerase III sind lila und die Erkennungssequenzen für EcoRI sind dunkelgrün unterlegt.)

1. Strang_cMyc-677

5'-GATCCGCAGCGACTCGGAAGAAGATTCAAGAGATCTTCTTCCGAGTCG
CTGCTTTTTTGAATTCA-3'

Komplementärstrang_cMyc-677

5'-AGCTTGAATTCAAAAAGCAGCGACTCGGAAGAAGATTCAAGAGATC
TTCTTCCGAGTCGCTGCG-3'

1. Strang_cMyc-920

5'-GATCCGCAGGGTCCTCAAACAGATTCAAGAGATCTGTGTTGAGGACC
CTGCTTTTTTGAATTCA-3'

Komplementärstrang_cMyc-920

5'-AGCTTGAATTCAAAAAAGCAGGGTCCTCAAACAGATTCAAGAGA
ATCTGTTTGAGGACCCTGCG-3'

1. Strang_cMyc-1196

5'-GATCCGGAGGAGAGAACAGTTGAAAATCAAGAGATTTCAACTGTTCTC
TCCTCCTTTTGAATTC-3'

Komplementärstrang_cMyc-1196

5'-AGCTTGAATTCAAAAAAGGAGGAGAGAACAGTTGAAAATCAAGAGAT
TTCAACTGTTCTCTCCTCCG-3'

1. Strang_cMyc-1374

5'-GATCCGCTGTGCGACTTAACTTGAATCAAGAGATCAAGTTAAGTCGCA
CAGCTTTTGAATTC-3'

Komplementärstrang_cMyc-1374

5'-AGCTTGAATTCAAAAAAGCTGTGCGACTTAACTTGAATCAAGAGATCA
AGTTAAGTCGCACAGCG-3'

2.3.4 Ligation der DNA Fragmente

Die Ligation von DNA-Fragmenten dient hier dazu, ein Insert in einen Vektor einzufügen, nachdem aus diesem mit Hilfe von BamH1 und HindIII die scrambled DNA heraus geschnitten worden ist. Als Vektor-DNA für Knockdown-Plasmide wurden ein pEGFP-H1-shRNA Vektor sowie ein pEGFP-U6-shRNA Vektor verwendet (vgl. Abb. 7).

Der Ligationsansatz lautete wie folgt:

10x Ligationspuffer (Promega)	1 µl
Vektor	1 µl
Insert	1 µl
T4 DNA-Ligase (Promega)	1 µl

Der Ansatz wurde bei 22°C für 2,5 h inkubiert und anschließend für die Transformation kompetenter Zellen verwendet. Die beiden Vektoren unterscheiden sich durch ihre Promotoren; der eine beinhaltet den humanen H1 Promoter, der andere den Mauspromoter U6.

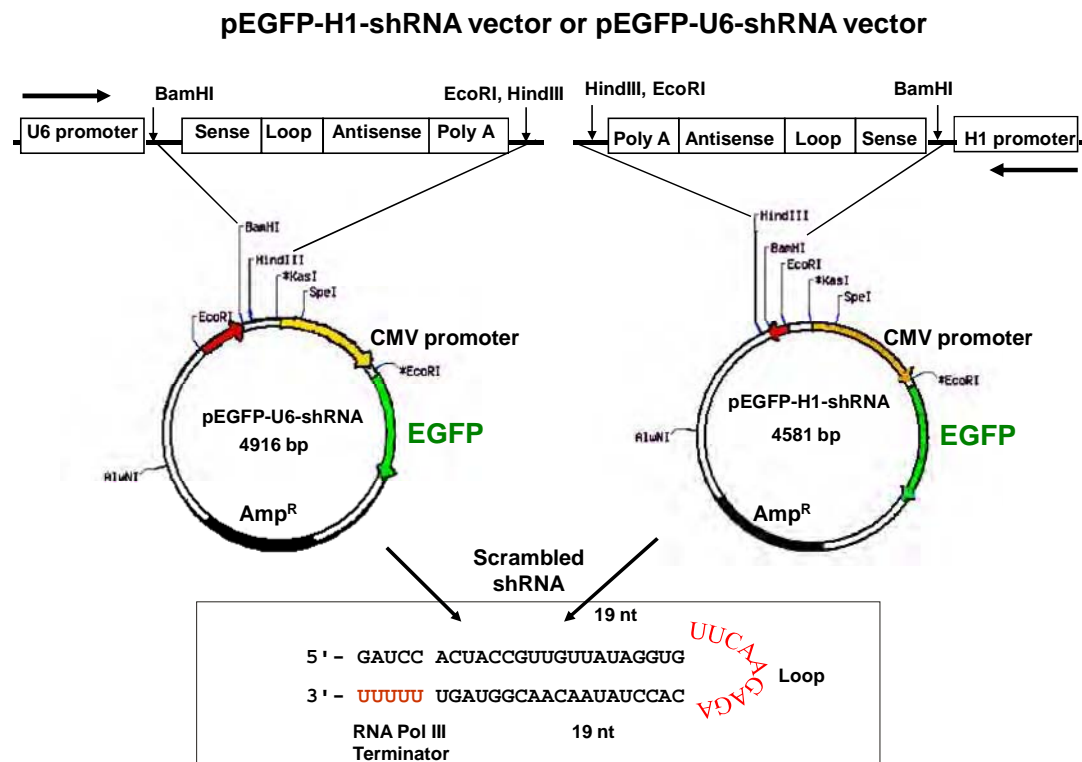


Abb. 7 pEGFP-H1-shRNA Vektor und pEGFP-U6-shRNA Vektor (nach Dai et al., 2005)

Beide verfügen über ein *Ampicillin Resistenz* Gen, über den CMV Promoter für das *EGFP* Gen und über zwei *EcoRI* Schnittstellen. Darüber hinaus beinhaltet der Vektor den U6 bzw. den H1 Promotor, die beide mit der RNA Polymerase III zusammen funktionieren. Hier wird die Sequenz einer „scrambled shRNA“ gezeigt, die als Negativkontrolle neben den Zielsequenzen benutzt wurde.

2.3.5 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Der Vorgang der Transformation dient der Vervielfältigung der fertigen Plasmide mit Hilfe von transformationskompetenten *Escherichia coli* (Zymo). Diese wurden bei -80°C gelagert und auf Eis aufgetaut.

Der Transformationsansatz lautete wie folgt:

<i>E. coli</i>	12,5 µl
Plasmid DNA	1,2 µl

Der Ansatz wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben, gemischt und 20 min lang auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf LB-Agar Nährböden, die Ampicillin (Sigma) enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Da nur transformierte Zellen das Ampicillin-Resistenzgen enthielten, konnten auch nur diese auf dem Nährboden wachsen.

2.3.6 Anlegen der Bakterienkultur

Von jedem Nährboden wurden je drei Klone mit der Pipettenspitze aufgenommen. Die Klone waren mittlerer Größe, isoliert und ohne Satellitenkolonien. Danach wurden 12 Minikulturen angelegt. Eine Kultur bestand aus 5 ml LB-Medium und 5 µl Ampicillin. Die somit entstandenen Kulturen wurden bei 37°C für ca. 17 h in einem Schüttelinkubator (Inova 4230, New Brunswick Scientific) bei 225 rpm inkubiert.

2.3.7 Lagerung einer Stammlösung transformierter Zellen

Zur Lagerung der transformierten Zellen wurden 500 µl Flüssigkultur mit 500 µl 30% Glycerol (Sigma) in PBS zusammengegeben. Das Glycerol-PBS-Gemisch musste zuvor autoklaviert werden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C in einem Tiefkühlgerät (Heraeus).

2.3.8 Minipräparation der Plasmide

Die Minipräparation der Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines Miniprep Kits (QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen) durchgeführt.

Als erstes wurde die Kultur bei 5000 rpm über 15 min bei 4°C zentrifugiert.

Das durch Zentrifugation entstandene Pellet wurde durch Zugabe von 250 µl Puffer p1 (Resuspensionspuffer) resuspendiert. Anschließend wurden je 250 µl des Puffers p2 (Lyse-Puffer) und des Puffers N3 (Neutralisationspuffer) hinzugegeben.

Der Ansatz wurde bei 13000 rpm über 10 min zentrifugiert und der Überstand in den im Kit enthaltenen blauen Filter gegeben. Das Ganze wurde dann bei 10000 rpm 1 min lang zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 750 µl Waschpuffer (PE Puffer) gewaschen und erneut bei 10000 rpm 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nun getrocknet und erneut bei 10000 rpm 1 min zentrifugiert.

Als letztes wurde das Pellet je nach benötigter Menge auf Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt und diesen jeweils 50 µl TE-Puffer hinzugefügt. Nach 2-minütiger Inkubation wurde die Suspension ein letztes Mal bei 10000 rpm über 2 min zentrifugiert.

2.3.9 Enzymatischer Restriktionsverdau

Das mit dem Insert versehene Plasmid besitzt im Gegensatz zu einem Plasmid ohne Insert eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle für die Restriktionsendonuklease EcoRI.

Dies bedeutet, dass in der sich anschließenden Gelelektrophorese nicht nur zwei, sondern drei Banden zu erkennen sind, im Gegensatz zu einem Plasmid, welches kein Insert beinhaltet.

Der Restriktionsansatz lautete wie folgt:

Reaktionspuffer (Roche)	2,0 µl
Restriktionsenzym EcoRI (Roche)	1,2 µl
DNA-Plasmid	7,0 µl
ddH ₂ O	6,8 µl

Der Ansatz wurde bei 37°C für 60 min in einem Thermocycler inkubiert.

2.3.10 DNA Agarose Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1% Agarosegels wurden 1,2 g Agarose (Sigma) in 120 ml TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Das heiße Gel wurde anschließend in die Gel-Kammer (Peqlab), die bereits 7 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma) enthielt, gefüllt.

Um Aussparungen zum Laden der DNA-Proben zu bilden, wurden ein oder zwei Kämme in das flüssige Gel eingebracht.

Die beim vorangegangenen Restriktionsverdau entstandenen Proben wurden dann mit 4 µl Beladepuffer (New England Biolabs) versetzt und aufgetragen. Zusätzlich wurden 2 DNA Markermischungen, ein 100 bp DNA Marker und ein 1 kb DNA Marker (New England Biolabs) in die Aussparungen des Gels eingebracht. Je 3 µl der Marker wurden mit je 7 µl ddH₂O und 2,5 µl Ladepuffer gemischt. Zunächst wurde das Gel bei 60 V (PS 3002, GIBCO) für 5 min und anschließend bei 120 V für 50 min betrieben. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht (Raytest) detektiert, was ein Auswählen der Klone möglich machte. Die Größe der Restriktionsfragmente wurde durch einen Vergleich mit zwei Markern abgeschätzt (vgl. Abb. 8 a)).

Diese besitzen folgende Fragmente:

1kb Marker in kb: 10 – 8 – 6 – 5 – 4 – 3 – 2 – 1,5 – 1 – 0,5

100bp Marker in kb: 1,5 – 1,2 – 1 – 0,9 – 0,8 – 0,7 – 0,6 – 0,5 – 0,4 – 0,3 – 0,2 – 0,1

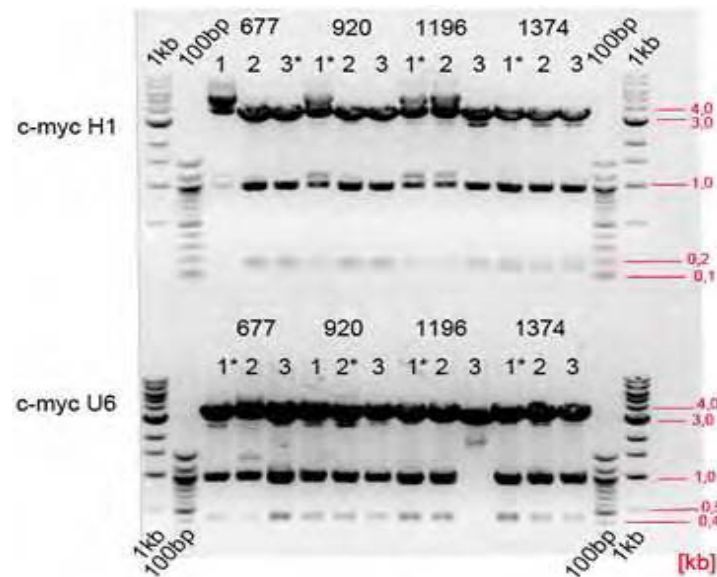


Abb. 8 a) Restriktionslängenanalyse der Plasmide für c-myc

Oben: Erkennbar ist, dass der Hauptteil der Banden bei ca. 0,15 kb, 1 kb und 3,5 kb liegt. Die Klone mit dem * wurden für die Knockdown Experimente ausgewählt. Der Klon 677,1 zeigt keine Bande bei 0,15. **Unten:** Die Banden des geschnittenen U6-Vektors ergeben hier hauptsächlich die Größe: 0,4 kb, 1,0 kb und 3,5 kb. Der Klon 1196, 3 hat die Bande bei 3,5 kb und eine weitere bei 2,5 kb.

Anhand der Gelelektrophorese konnte überprüft werden, ob die Klone die gewünschten drei Banden und eine charakteristische Größe aufweisen. Daraufhin wurden die folgenden Klone ausgewählt, wobei einige - die hier fett gedruckt - noch einer zweiten enzymatischen Restriktion unterzogen wurden (vgl. Abb.8 b)).

c-myc H1 677, 3

c-myc U6 677, 1

c-myc H1 920, 1

c-myc U6 920, 2

c-myc H1 1196, 1

c-myc U6 1196, 1

c-myc H1 1374, 1

c-myc U6 1374, 1

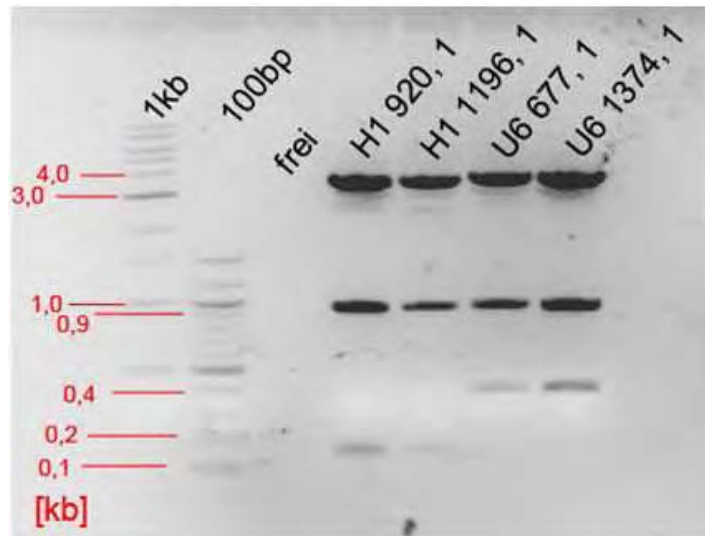


Abb. 8 b) Restriktionslängenanalyse zur Absicherung der in Abb. 7 a) ausgewählten Klone von *c-myc*

Die Klone zeigen deutliche und klare Banden in folgenden Größen: H1: 0,15 kb, 0,95 kb und 3,5 kb. U6: ~0,4 kb, 0,95 kb und 3,5 kb.

Bei dieser zweiten Gelelektrophorese wurde ebenfalls die Bandenanzahl und die Fragmentgröße überprüft. Diese Klone entsprachen wie die oben bereits ausgewählten den gewünschten Anforderungen und konnten somit ebenfalls verwendet werden.

2.3.11 Midipräparation der Plasmide

Nach der Gelelektrophorese wurde anhand der Existenz von 3 Banden je ein Klon pro Plasmid selektiert. Um eine Midikultur anlegen zu können, musste zunächst die komplette Glycerolstock in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben werden. Der Ansatz wurde dann 17 h bei 37°C und 225 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Midipräparation wurde mit Hilfe eines Midi Kits (Nucleo Bond extra Midi, Machery-Nagel) durchgeführt.

Nach erfolgter Inkubation wurde die Zellsuspension bei 5000 rpm und 4°C 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 8 ml Resuspensionspuffer resuspendiert, mit 8 ml Lysis-Puffer lysiert und anschließend 5 mal invertiert. Nach Äquilibration der Säule mit 12 ml Äquilibrationpuffer fand die Neutralisation mit 8 ml Neutralisationspuffer statt. Danach wurde die Säule beladen und mit 5 ml

Äquilibrationpuffer gewaschen. Nach Entfernen des Filters wurde erneut mit 8 ml Waschpuffer gewaschen und mit 5 ml Elutionspuffer eluiert. Anschließend wurden die Plasmide mit Hilfe von 3,5 ml Isopropanol über die Dauer von 2 min ausgefällt und bei 5000 rpm und 4°C 90 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 5000 rpm über 10 min zentrifugiert. Das überständige Ethanol wurde abpipettiert und das Pellet in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Als letztes wurde das Plasmid in 50-100 µl TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

2.3.12 Ermittlung der Plasmidkonzentration

Da der gewünschte Effekt der RNAi eine Plasmidkonzentration von mindestens 2,5 µg/µl voraussetzt (Dai et al., 2005), wurde diese photometrisch bestimmt.

Die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Konzentrationen wurden in TE-Puffer bestimmt. Es wurde eine Mischung aus 1 µl H1 1374, 1 und 1,62 µl H1 677, 3 verwendet, wodurch sich eine finale Konzentration des jeweiligen Plasmids von ca. 3,2 µg/µl ergab.

c-myc	c[µg/µl]
H1 677, 3	5,15
H1 920, 1	7,3
H1 1196, 1	5,0
H1 1374, 1	8,35
U6 677, 1	6,8
U6 920, 2	8,8
U6 1196, 1	9,55
U6 1374, 1	12,6

Tab. 1 Konzentrationen der Plasmide

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Plasmide mit den entsprechenden Konzentrationen der jeweiligen Klone nach der Midipräparation.

2.4 In Ovo Elektroporation

2.4.1 Vorbereitung

Die Inkubation der Eier erfolgte zwischen 50 und 64 h vor der Operation. Das Operationsbesteck wurde sterilisiert und der Operationstisch unmittelbar vor der Operation mit 70% Ethanol gereinigt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Eier aus dem Inkubator entnommen und diaphanoskopisch die Position des Embryos markiert. Anschließend wurde die Eischale mit 70% Methanol gereinigt und die markierte Stelle der Eischale mit Durapore™ tape (3M Health care) abgeklebt. An dem stumpfen Pol des Eies wurde mit einer Schere sowohl die Eischale als auch die äußere Eimembran penetriert. Durch das entstandene Loch konnte dann eine sterile Nadel (100Sterican®, Braun) eingeführt werden, um 2 ml Albumin abzusaugen. Hierbei kam es zu einem Absinken des Embryos. Dadurch konnte nun die abgeklebte Stelle der Eischale mit Hilfe einer Schere zum sogenannten Arbeitsfenster eröffnet werden, ohne dass dabei der Embryo zu Schaden kam. Um die Position des Eies zu stabilisieren, wurde dieses in ein sogenanntes Nest, eine mit Alufolie und Tupfer ausgekleidete Petrischale, gestellt. Der Flüssigkeitsspiegel innerhalb des Eies konnte wieder auf das ursprüngliche Niveau gebracht werden, indem unter Zuhilfenahme einer Plastiktransferpipette (3ml Falcon®, Becton Dickinson Labware) Lockelösung auf den Embryo getropft wurde. Um den Kontrast zwischen dem Embryo und dem darunterliegenden Eigelb zu erhöhen, erfolgte eine Tuscheinjektion (Pelikan, 10% in Lockelösung) zwischen die Keimscheibe und das Dotter.

Zum Einbringen des jeweils verwendeten Plasmids wurden Elektroden aus Platin (für die Anode) und aus Wolfram (für die Kathode) benötigt. Die Herstellung erfolgte aus Drähten, die dann auf einen Griff aufgesetzt und zweckmäßig zurecht gebogen wurden. Um eine unerwünschte Ausbreitung des elektrischen Feldes zu verhindern, wurden die Elektroden mit Ausnahme einer kleinen Fläche mit Nagellack isoliert. Außerdem wurden Injektionsnadeln benötigt, die aus Borosilicat Glas Kapillaren (1,1mm Innendurchmesser, Sutter Instruments) mit Hilfe eines Mikropipetten Pullers (Model P-97, Sutter Instruments) ausgezogen wurden.

Um das jeweilige Plasmid nach Injektion in den Embryo besser wahrnehmen zu können, wurde es nach der Verdünnung zu einer Konzentration von 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit einer zuvor hergestellten Fast Green Powder-Lösung (Sigma) versetzt.

2.4.2 Operationstechnik

Unter einem Dissektionsmikroskop (MZ 75, Leica) wurde die Vittelinmembran von Embryonen des Stadiums HH 15 bis HH 17 mit Hilfe einer Wolframdrahtnadel geöffnet und zur Seite geschoben. Falls nötig wurde mit derselben Wolframdrahtnadel das Amnion auf Höhe der Hinterextremitäten zur Seite geklappt. Um das Plasmid in den Embryo einbringen zu können, wurde ein Aspiratorschlauch (Sigma) benötigt. Die Mikrokapillaren wurden auf das eine Ende, der Mund auf das andere Ende aufgesetzt. Durch Ansaugen konnte somit die mit Fast Green Powder-Lösung versetzte DNA-Lösung in die Kapillare aufgenommen werden.

Die mit DNA-Lösung gefüllte Kapillare wurde dann unter dem Mikroskop vorsichtig von kaudal in den vorletzten neu gebildeten Somiten rechts des Neuralrohrs eingeführt. Von dort wurden dann nach kranial weitere Somiten auf die Kapillare aufgefädelt. Beim Zurückziehen der Kapillare wurde die DNA-Lösung infolge einer Blasbewegung des Mundes injiziert. Nach erneutem Auftröpfeln von Lockelösung wurde die Kathode rechts und die Anode links des Embryos positioniert, und zwar parallel zum Embryo ohne diesen oder das Blastoderm zu berühren. Da der Stromfluss von der Anode zur Kathode erfolgt und die Plasmide negativ geladen sind, wandern diese dann in Richtung Kathode; hier also zur lateralen Dermomyotomlippe (vgl. Abb. 9). Sollte nicht die laterale Dermomyotomlippe sondern die mediale Dermomyotomlippe elektroporiert werden, wurde die Anode rechts und die Kathode links des Embryos angesetzt. Mit einem Fußpedal konnte dann der Elektroporator (TSS 20 Ovodyne Elektroporator, Intracel) ausgelöst werden.

Die Elektroporation wurde zunächst bei Stadium HH 17 auf Höhe der Hinterextremitäten durchgeführt. Da sich hierbei dann aber herausstellte, dass durch die Auswanderung der Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe ein Knockdown-Nachweis in der lateralen Dermomyotomlippe schwer zu beurteilen ist, wurden daraufhin Embryonen der Stadien HH 15 und HH 16 gewählt. Bei diesen

wurden die Somiten im Zwischenextremitätenbereich elektroporiert, da hier keine Auflösung der Expressionsdomänen stattfindet und sich somit die Normalexpression auf einen Bereich beschränkt.

Die Elektroporation wurde bei 50 V mit 5 Impulsen von 20 ms Länge und 200 ms Intervallen durchgeführt.

Anschließend wurde das Arbeitsfenster des Eies mit Durapore™ tape verschlossen und der Embryo für 24 oder 36 h reinkubiert.

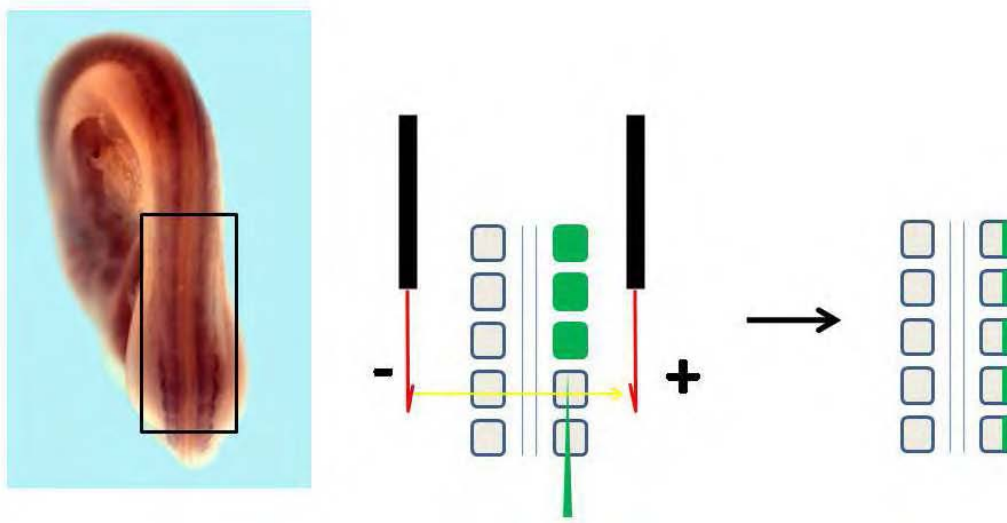


Abb. 9 Ablauf der Elektroporation

Auf dem linken Foto sind beiderseits des Neuralrohres die Somiten erkennbar (Es wurde ein Foto eines Embryos nach In-Situ Hybridisierung gewählt, um die Somiten deutlicher zeigen zu können). Das Plasmid wird in die rechten Somiten und anschließend durch entsprechende Haltung der Elektroden in die Zellen der lateralen Dermomyotomlippe eingebracht.

2.4.3 Dokumentation

Bereits vor der Fixierung der Embryonen konnte der Erfolg der Elektroporation unter einem Dissektions-Fluoreszenzmikroskop (MZFL III, Leica) kontrolliert und fotografisch dokumentiert werden. Dies war deshalb möglich, da das injizierte Plasmid nicht nur das shRNA-Konstrukt enthielt, sondern auch für das Fluoreszenz-Reporterprotein EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) kodierte. Dieses konnte mit Hilfe eines EGFP 1- bzw. EGFP 2-Filters unter dem Dissektions-Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Teilweise war dies sogar noch im Ei durch das Arbeitsfenster möglich, teilweise mussten die Embryonen aber auch aus dem Ei entnommen werden. War dies der Fall, so wurden sie in Lockelösung gewaschen und die Eihäute entfernt. Zur besseren Positionierung unter dem Mikroskop wurden die Embryonen in eine sterile Petrischale mit einer sterilen, dünnen Schicht Agarose überführt, die mit Lockelösung gefüllt war. In die Agaroseschicht konnten nach Bedarf Vertiefungen geschnitten werden, in denen die Embryonen in bestimmten Perspektiven adjustiert werden konnten.

Die Fotodokumentation erfolgte durch eine Digitalkamera (DC 300F, Leica) in verschiedenen Vergrößerungsstufen (1,6x, 2,5x, 3,2x, 4,0x, 5,0x, 6,3x).

Anschließend wurden die Embryonen in 4% PFA in PBT für 1-2 Tage bei 4°C fixiert.

2.5 Methoden zur Auswertung der Embryonen

2.5.1 Whole-mount In-Situ Hybridisierung

Zur Darstellung der mRNA-Expression wurde die Methode der In-Situ Hybridisierung nach Patel, sowie die Methode der In-Situ Hybridisierung nach Birchmeier angewendet. Bei beiden binden zuvor hergestellte RNA-Sonden durch Hybridbildung an die zu untersuchende mRNA. Die Sonde stellt das Transkript des Antisense-Stranges der cDNA dar und ist mit Digoxigenin markiert. Hierdurch kann durch spätere Zugabe von Anti-Digoxigenin-Antikörpern und einer entsprechenden Farbreaktion die Sonde und somit die Orte der mRNA-Expression sichtbar gemacht werden. Die Methode nach Birchmeier stellt eine modifizierte In-Situ Hybridisierungsmethode dar, die speziell bei sehr sensiblen Sonden, zu denen auch *c-myc*-Sonde zählt, Anwendung findet. Unterschiede der beiden Methoden finden sich ab dem Schritt der Fixation der Embryonen.

2.5.1.1 Herstellung der RNA-Sonde

a) Linearisierung des Plasmids

Die Sequenz einer Sonde wird als Insert in einem Plasmid gelagert. Um eine Antisense-Sonde herstellen zu können, musste das entsprechende Plasmid daher zunächst mit einer passenden Restriktionsendonuklease linearisiert werden. In dem Fall der *c-myc*-Sonde wurden zwei verschiedene Vektoren verwendet. Zum einen handelte es sich um einen pSP64 Poly(A) Vektor mit einer Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease PVU II. Zum anderen handelte es sich um einen pDrive Vektor. Als Restriktionsendonuklease wurde hier HindIII verwendet. Das verwendete Insert war in beiden Fällen das gleiche. Im Fall von Pax3 wurde ein pGEM7Z Vektor mit Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen HindIII und DrrI und für die Lbx1-Sonde wurde ein pDrive Vektor mit einer Schnittstelle für HindIII verwendet.

Der Linearisierungsansatz lautete wie folgt:

Plasmid	10,0 µg
Restriktionsendonuklease	2,0 µl
Buffer M	10,0 µl

Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl ergänzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe von 1% Agarosegel und TAE-Puffer wurden die geschnittenen Plasmide getestet. Die Aufreinigung erfolgte mit dem „MinElute PCR Purification kit (250)“ (Qiagen). Hierfür wurde zunächst das 5fache Volumen an PBI-Puffer zum Ansatz gegeben und gemischt. Nach Aufstecken der Säule auf das Sammelröhrchen wurde der Ansatz auf die Säule gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 1 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur. Der Durchfluss wurde verworfen und 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben. Nach weiterer Zentrifugation über 1 min bei 14000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und erneut zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend auf ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß

gesteckt, 50 µl EB-Puffer auf die Mitte der Membran gegeben und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Daraufhin folgte noch eine letzte Zentrifugation für 1 min bei 14000 rpm. Die Konzentration der eluierten DNA wurden photometrisch mit einer Verdünnung von 1:100 gemessen.

b) Transkription

1 µl des linearisierten Plasmids wurde dann *in vitro* transkribiert. Entsprechend des zugänglichen Promoters wurde die RNA-Polymerase (Roche) gewählt. Beim pSP64 Vektors handelte es sich hierbei um die RNA-Polymerase SP6, bei dem pDrive Vektor und dem pGEM7Z Vektor um die RNA-Polymerase T7. Die RNA wurde mit einem NTP-Markierungsmix (Roche), der digoxigeninmarkiertes UTP enthielt, markiert.

Der Transkriptionsansatz lautete wie folgt:

10x Transkriptionspuffer	2,0 µl
Dithiothreitol (Sigma)	2,0 µl
NTP-Markierungsmix (Roche)	2,0 µl
RNA	1,0 µl
RNAse Inhibitor	0,5 µl
RNA-Polymerase	2,0 µl

Der Ansatz wurde mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl ergänzt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Durch folgende Mischung wurde die RNA ausgefällt:

Transkriptionsansatz	20,0 µl
DEPC-H ₂ O	80,0 µl
Glykogen	1,0 µl
10M Ammonium-Azetat	35,0 µl
100% Ethanol (-20°C)	250,0 µl

Die Mischung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit 14500 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert (Mini Spin 14500, Eppendorf). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 70% DEPC-Ethanol gewaschen. Anschließend wurde ein zweites Mal unter denselben Bedingungen zentrifugiert und hierauf der neu entstandene Überstand wieder verworfen. Das Pellet wurde, nachdem es getrocknet war, in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.5.1.2 Whole-mount In-Situ Hybridisierung nach Patel

a) Isolierung und Fixierung der Embryonen

Die Isolierung und Fixierung musste unter RNase freien Bedingungen durchgeführt werden. Das inkubierte Hühnerei wurde vorsichtig eröffnet und in eine Boveri-Schale überführt. Mit einer Iridektomieschere wurde seitlich des Blastoderms die Eigelbmembran durchtrennt und ein Sieblöffel durch die entstandene Öffnung eingeführt. Dieser wurde unter den Embryo geschoben, sodass mit der Iridektomieschere dann das Blastoderm um den Embryo herum abgeschnitten werden konnte.

Der Embryo wurde mit Hilfe des Sieblöffels in eine mit Lockelösung gefüllte Petrischale überführt. Unter einem Dissektionsmikroskop (MZ 75, Leica) wurde dann zunächst unter Zuhilfenahme einer Pinzette und der Iridektomieschere die Vitellinmembran entfernt. Anschließend erfolgte die vorsichtige Abtrennung des

restlichen Blastoderms und des extraembryonalen Gewebes. Als letztes musste das Herz sowie die Nasenhöhle und die Hirnbläschen eröffnet werden, um eine Farbensammlung während der In-Situ Hybridisierung in diesen Körperhöhlen zu verhindern.

Nach der gelungenen Isolierung der Embryonen wurden diese in eine 4% PFA/PBT-Lösung überführt und bei 4°C darin für 24-48 h fixiert.

Um die Embryonen auch über längere Zeit lagern zu können, erfolgte nach der Fixierung in 4% PFA/PBT die schrittweise Überführung in Methanol.

Hierbei wurden die Embryonen auf Eis jeweils 15 min nacheinander in 100% PBT, 25% Methanol (in PBT), 50% Methanol (in PBS), 75% Methanol (in DEPC-H₂O) und 100% Methanol gewaschen. Nach dem letzten Waschgang konnten die Embryonen in 100% Methanol bei -20°C gelagert werden.

b) Hybridisierung und Färbung

1. Tag: Prähybridisierung

Alle Schritte wurden auf einer Schüttelplatte (Titramax 101, Heidolph) durchgeführt. Nachdem die Embryonen auf die einzelnen Vertiefungen einer Zellkulturplatte (24 well plate, Corning Inc.) verteilt wurden, erfolgte die schrittweise Rehydrierung auf Eis. Hierbei wurden die Embryonen jeweils 15 min nacheinander in 75% Methanol (in DEPC-H₂O), 50% Methanol (in PBS), 25% Methanol (in PBT) und in 100% PBT gewaschen.

Das anschließende Bleichen wurde nur bei Embryonen, die älter als Stadium HH 23 waren, durchgeführt. Das Bleichen fand auf Eis in einer 6% H₂O₂-Lösung (in PBT) über 1 h statt. Im Anschluss musste die restliche H₂O₂-Lösung durch drei 10-minütige Waschgänge in PBT auf Eis aus den Vertiefungen der Zellkulturplatte entfernt werden.

Als nächstes folgte die Proteolyse mit einer Proteinase K-Lösung (20 µg pro ml PBT). Die Dauer dieses Schrittes war abhängig von dem Stadium des vorliegenden Embryos und variierte zwischen 5 und 25 min. Je älter der Embryo war, desto länger dauerte die Proteolyse. Nach Beendigung folgten wiederum zwei 10-minütige

Waschgänge in PBT auf Eis. Danach wurden die Embryonen über 30 min in 0,2% Glutardialdehyd (in 4% PFA) postfixiert und im Anschluss abermals zweimal 10 min in PBT gewaschen. Als letzter Schritt an diesem Tag fand die Prähybridisierung statt. Die Embryonen wurden hierbei über Nacht bei 60°C mit Hybridisierungslösung im Hybridisierungssofen (Shake`N`Stack, Hybaid) inkubiert.

2.Tag: Hybridisierung

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung durch frische ersetzt. Außerdem wurde pro Embryo 1 µl der digoxigeninmarkierten RNA-Sonde hinzugefügt und die Embryonen bei 60°C für 48 bis 62 h inkubiert.

3. Tag: Antikörper-Inkubation

Im Anschluss an die Hybridisierung fand die Posthybridisierungswaschung statt. Zuerst wurden die Embryonen zweimal über 30 min in 0,1% CHAPS in 2x SSC und dann zweimal über 30 min in 0,1% CHAPS in 0,2x SSC bei 60°C gewaschen. Danach folgten drei 10-minütige Waschungen in TBST und eine 4-stündige Inkubation der Embryonen in einer 20% Lammserumlösung.

In der Zwischenzeit konnte die Antikörperlösung mit Lammserumlösung auf eine Konzentration von 1:2000 verdünnt und für ebenfalls 4 h auf Eis inkubiert werden. Nach Ablauf der 4 h wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C in der Antikörperlösung inkubiert.

4. Tag: Auswaschen der Antikörper

Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Embryonen zweimal 10 min, dann zweimal 30 min und anschließend fünfmal 60 min in TBST gewaschen. Über Nacht wurden sie bei 4°C in TBST inkubiert.

5. Tag: Farbreaktion

Nach dreimaligem Waschen der Embryonen in alkalischem Phosphatase-Puffer bei Raumtemperatur wurden sie im Dunkeln mit der Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung bestand aus 4,5 µl/ml NBT und 3,5 µl/ml BCIP in alkalische Phosphatase-Puffer. Die Dauer des Färbeschrittes wurde entsprechend der Größe der Embryonen und der sichtbaren Farbreaktion variiert. War die Färbung zu stark, wurde eine Behandlung mit Diethylamin angeschlossen, welches den Embryo langsam entfärbte. Die Färbereaktion wurde durch dreimaliges Waschen in PBS beendet. Zur Fixierung wurden die Embryonen dann in 4% PFA/PBS überführt und bei 4°C gelagert.

2.5.1.3 Whole-mount In-Situ Hybridisierung nach Birchmeier

a) Isolierung und Fixierung der Embryonen

Der Vorgang der Isolierung der Embryonen entspricht dem der In-Situ-Methode nach Patel (siehe 5.1.2 a), wobei allerdings andere Lösungen verwendet werden. Anstatt der Lockelösung während der Isolierung wurde hierbei PBS verwendet. Die Fixation erfolgte in 4% PFA/PBT (PBT mit Tween 20) und bei der Überführung der Embryonen in Methanol wurde das Methanol in jedem Schritt mit PBT (mit Tween 20) verdünnt. Nach der Überführung der Embryonen in 100% Methanol wurden die Embryonen in 3% H₂O₂ über 1 h bei -20°C gebleicht und anschließend dreimal 10 min in 100% Methanol gewaschen. Im Anschluss daran wurden sie bei -20°C gelagert.

b) Hybridisierung und Färbung

1. Tag: Prähybridisierung und Hybridisierung

Alle Schritte fanden bei 4°C und unter RNasefreien Bedingungen auf einer Schüttelplatte statt. Die Embryonen wurden zuerst auf die einzelnen Vertiefungen

einer Zellkulturplatte verteilt und für je 10 min einmal in 75% Methanol/PBT, 50% Methanol/PBT, 25% Methanol/PBT und zweimal in PBT gewaschen. Anschließend erfolgte die Proteolyse mit 10 µg/ml Proteinase K in PBT bei Raumtemperatur. Die Dauer dieses Schrittes war abhängig von der Größe der Embryonen und betrug zwischen 20 und 30 min. Die Inaktivierung der Proteinase K fand mit Hilfe von 2 mg/ml Glycin in PBT über 2 min statt. Danach wurden die Embryonen erneut zweimal 10 min mit PBT gewaschen und über 20 min in 0,2% Glutaraldehyd in 4% PFA/PBT postfixiert. Das Postfixans wurde mit PBT dreimal über 10 min ausgewaschen. Anschließend fand die Prähybridisierung statt. Hierzu wurden die Embryonen zunächst in Hybridisierungslösung equilibriert und dann 2 h bei 70°C mit Hybridisierungslösung inkubiert. Nach Beendigung der Prähybridisierung wurden die Embryonen je mit 1 bis 2 µl der digoxigeninmarkierten RNA-Sonde in 1 ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 70°C hybridisiert.

2. Tag: Antikörperinkubation

Bevor die Embryonen mit den Antikörpern inkubiert werden konnten, mussten sie erst gründlich gewaschen werden. Als erstes zweimal kurz, dann einmal 30 min lang mit der Waschlösung 1 bei 70°C. Danach mit der Waschlösung 2 zweimal 30 min lang bei 65°C. Im Anschluss einmal 20 min lang bei 65°C in einer Mischung aus Waschlösung 1 und MABT (1:1) und daraufhin dreimal 30 min lang in MABT bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Waschgänge wurden die Embryonen für 2 h bei 4°C in 2% Blockingpulver (Boehringer)/20% Lammserum/MABT inkubiert. Die Herstellung hiervon erfolgte folgendermaßen: 2% Blocking-Pulver wurden in MABT gelöst und bei 55°C über 30 min inaktiviert. Im Anschluss wurde der Ansatz 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 20% Lammserum gemischt. Die eine Hälfte dieser Lösung wurde nun für die oben genannte Inkubation der Embryonen verwendet. Der anderen wurden im Verhältnis 1:1000 Anti-Digoxigenin-Antikörper zugesetzt und sie wurde bei 4°C über 2 h inkubiert. Nach Beendigung der 2 h wurde die 2%Blockingpulver/20% Lammserum/MABT-Mischung durch die Antikörperlösung ersetzt. Die Embryonen wurden darin über Nacht bei 4°C inkubiert.

3. Tag: Auswaschen der Antikörper und Farbreaktion

Alle Waschgänge fanden mit MABT bei Raumtemperatur statt. Zunächst zweimal kurz, dann zweimal über 15 min und als letztes sechs- bis zehnmal 30 min lang. Anschließend wurden die Embryonen kurz mit frisch hergestelltem NTMT-Puffer equilibriert. Als Färbelösung wurden 3,5 µl NBT (Roche) und 3,5 µl BCIP (Roche) mit 1 ml NTMT gemischt. Die Embryonen wurden mit dieser im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Der Färbevorgang dauerte zwischen 3 und 6 h und wurde durch mehrere Waschgänge in PBS beendet.

2.5.1.4 Whole-mount In-Situ Hybridisierung von Kontrollembrionen

Die Anfertigung von Kontrollembrionen erfolgte sowohl bei der In-Situ Hybridisierung nach Patel als auch bei der Methode nach Birchmeier. Der Ablauf war derselbe wie oben beschrieben, außer dass hierbei für die Hybridisierung anstatt der Antisense-Sonde die Sense-Sonde verwendet wurde.

2.5.2 Vibratomschnitte

Nach Elektroporation mit den shRNA-Konstrukten sowie nach Whole-mount In-Situ Hybridisierung wurden Vibratomschnitte angefertigt.

Da die Embryonen in 4% PFA/PBT gelagert wurden, mussten sie zunächst dreimal 10 min in PBT gewaschen werden.

In der Zwischenzeit wurde 4% Agarose (in ddH₂O) in der Mikrowelle, bis sie flüssig war, erhitzt und anschließend in eine Petrischale gefüllt.

Hierin konnte nun der Embryo überführt werden und entsprechend der gewünschten Schnittebene ausgerichtet werden. Nach Hartwerden der Agarose wurde der Embryo in einem Agarose-Block mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und mit Sekundenkleber (Uhu) auf die Halterungsplatte eines Vibratoms (Leica) geklebt.

Sobald der Kleber getrocknet war, wurde die Halterungsplatte in das Vibratom eingesetzt und der Agarose-Block mit ddH₂O vollständig bedeckt. Außerdem musste eine Rasierklinge in das Vibratom eingespannt werden.

Die Schnitte wurden mit einer Frequenz von 6 kHz, einer Geschwindigkeit von 5 mm/s und einer Schnittdicke von 40µm durchgeführt und direkt mit Hilfe eines Pinsels auf einen Objektträger übertragen. Die Eindeckelung erfolgte mit Aquatex. Für den Fall, dass die Embryonen nach einer Whole-mount In-Situ Hybridisierung zur Herstellung von Vibratomschnitten nicht stark genug gefärbt sind, besteht die Möglichkeit nach Schnittanfertigung und vor der Übertragung auf den Objektträger, die Embryonen erneut zu färben. Der Vorgang ist identisch mit der in der Whole-mount In-Situ Hybridisierung beschriebenen Farbreaktion.

2.5.3 Fluoreszenz-Immunhistochemie

Die Fluoreszenz-Immunhistochemie wurde verwendet, um in Hühnerembryonen nach gelungener in ovo Elektroporation sowohl mit einem shRNA-Konstrukt als auch mit einem Kontrollplasmid das EGFP sichtbar zu machen.

Um eine Fluoreszenz-Immunhistochemie durchführen zu können, wurden zunächst Vibratomschnitte der Embryonen nach gelungener in ovo Elektroporation angefertigt. Zur Markierung mit dem EGFP-Antikörper wurden die Schnitte dann zweimal über 10 min in PBS gewaschen, bevor sie für 30 min in 1% bovines Serumalbumin (BSA, Sigma) in PBS inkubiert wurden. Dies dient dazu, unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Danach wurde der Erstantikörper Rabbit-anti-EGFP (Torrey Pines Biolabs Inc.) in einer Verdünnung von 1:200 in 1% BSA zu den Vibratomschnitten hinzugegeben. Diese Inkubation fand im Dunkeln über mindestens 90 min statt. Anschließend wurden die Schnitte zweimal über 10 min in PBS gewaschen, bevor der Zweitantikörper hinzugegeben wurde. Der Zweitantikörper Cy2 Goat-anti-rabbit-IgG (Dianova) wurde mit PBS im Verhältnis 1:200 verdünnt. Nach einer Inkubationsdauer von 90 min wurden die Schnitte erneut 10 min lang in PBS gewaschen.

2.5.4 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation von Totalpräparaten erfolgte an einem Dissektions-Fluoreszenzmikroskop (MZFLIII, Leica) in verschiedenen Vergrößerungsstufen.

Für die Analyse von Fluoreszenz-Färbungen wurde ein EGFP 1- sowie ein EGFP 2-Filter verwendet. Zur Dokumentation diente eine Digitalkamera (DC 300F, Leica).

Die Embryonen wurden zum Fotografieren in eine mit PBS gefüllte Petrischale gelegt. Diese war mit Agarose ausgekleidet und enthielt verschieden große Vertiefungen zum besseren Adjustieren der Embryonen.

Vibratomschnitte wurden mit einem Axioskop der Firma Zeiss mit Hilfe einer Digitalkamera (DFC 320, Leica) fotografiert.

Die Archivierung der Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0.

3. Ergebnisse

3.1 Das Expressionsmuster von *c-myc* in den Somiten auf Höhe der Hinterextremitäten sowie in den Gliedmaßenanlagen

Zur Beschreibung des Expressionsmusters von *c-myc* wurden Hühnerembryonen der Stadien HH 17 bis HH 30 herangezogen.

3.1.1 Das Expressionsmuster im Stadium HH 17

Totalpräparat

Die Somiten auf Höhe der Hinterextremitäten zeigen im Stadium HH 17 eine sehr ausgeprägte Färbung in der lateralen Dermomyotomlippe (VLL). Im Bereich zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten ist dies weniger deutlich erkennbar. Die mediale Dermomyotomlippe (DML) ist in allen Somiten gleich stark gefärbt, jedoch ist die Färbung geringer als die der lateralen Dermomyotomlippe. Auffallend ist auch, dass sich die Expression in den älteren Somiten auf deren Randbereich beschränkt, während die neu gebildeten Somiten im Schwanzbereich komplett gefärbt sind (vgl. Abb. 10 A, C).

Vibratomschnitte

In den Vibratomschnitten auf Extremitätenhöhe bestätigt sich die deutliche Färbung in der lateralen Dermomyotomlippe. Eine geringe Expression ist in den hier noch epithelialen Zellen, die in späteren Stadien die mediale Dermomyotomlippe bilden, erkennbar. Eine weitere Expressionsdomäne stellen die Zellen zwischen der späteren medialen Dermomyotomlippe und dem Neuralrohr sowie das Sklerotom dar (vgl. Abb. 10 B, D).

3.1.2 Das Expressionsmuster im Stadium HH 18

Totalpräparat

Im Stadium HH 18 zeigt sich eine stärkere Expression in der medialen Dermomyotomlippe als im Stadium HH 17. Die laterale Dermomyotomlippe auf Höhe der Hinterextremitäten ist ebenfalls stark angefärbt. Außerdem sind migrierende Zellen, aus der lateralen Dermomyotomlippe in die Gliedmaßenanlage für eine Expression von *c-myc* positiv (vgl. Abb. 11 A-D).

Vibratomschnitte

Im Gegensatz zu den Vibratomschnitten des Stadiums HH 17 ist die stärkste Expression im Stadium HH 18 nicht in der lateralen oder medialen Dermomyotomlippe zu finden, sondern im Sklerotom. Ebenso weisen die migrierenden Zellen aus der lateralen Dermomyotomlippe eine Färbung auf (vgl. Abb. 11 E, F).

3.1.3 Das Expressionsmuster in den Stadien HH 20 und HH 21

Totalpräparate

In diesen Stadien ist eine starke Expression in der medialen Dermomyotomlippe sowie am kaudalen Rand der Somiten erkennbar. Die laterale Dermomyotomlippe ist nur noch zwischen den Vorder- und den Hinterextremitäten angefärbt. In den Hinterextremitäten können zwei Expressionsdomänen beobachtet werden, eine schwache in der dorsalen Vormuskelmasse und eine stärkere in der ventralen Vormuskelmasse (vgl. Abb. 12 A, C, E).

Vibratomschnitte

Die starke Expression in der medialen Dermomyotomlippe ist besonders deutlich in den Vibratomschnitten zu erkennen. Aber auch das Sklerotom weist, vor allem in unmittelbarer Nähe zum Myotom, eine deutliche Färbung auf. Ebenso sind Zellen

der lateralen Dermomyotomlippe für eine Expression von *c-myc* positiv. Die Separierung der dorsalen von der ventralen Vormuskelmasse ist nicht deutlich erkennbar (vgl. Abb. 12 B, D, F).

3.1.4 Das Expressionsmuster in den Stadien HH 22 und HH 23

Totalpräparate

Eine Expression ist in diesen Stadien deutlich in der medialen Dermomyotomlippe sowie im kaudalen Rand der Somiten erkennbar. Die laterale Dermomyotomlippe ist in dem Bereich zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten angefärbt. Auf Höhe der Hinterextremität ist keine Färbung mehr in der lateralen Dermomyotomlippe sowie auf der Strecke von der lateralen Dermomyotomlippe in die Gliedmaße erkennbar. Dafür kann eine starke, zungenförmige Expression in der dorsalen und ventralen Vormuskelmasse beobachtet werden. Im Stadium HH 22 stellt sich diese Färbung diffus verteilt dar, während sie sich im Stadium HH 23 vor allem auf den Randbereich der zungenförmigen Expression beschränkt (vgl. Abb. 13 a) A, B; Abb. 13 b)).

Vibratomschnitte

Diese Stadien sind gekennzeichnet durch eine starke Expression von *c-myc* im Sklerotom. Im Gegensatz zu den vorigen Stadien ist hier eine deutliche Separierung der dorsalen von der ventralen Vormuskelmasse zu erkennen (vgl. Abb. 13 a) C).

3.1.5 Das Expressionsmuster im Stadium HH 25

Totalpräparat

Das Expressionsmuster gestaltet sich in diesem Stadium ähnlich dem der vorigen Stadien. Allerdings stellt sich die Färbung in der Hinterextremität anders dar. Hier ist die zungenförmige Expression nicht mehr so deutlich zu erkennen. Stattdessen sind

verschiedene Bereiche der Gliedmaßen, die Vorläufer der späteren anatomischen Muskelblasteme, angefärbt (vgl. Abb. 14 A, B).

Vibratomschnitte

In den Vibratomschnitten ist eine Expression im Sklerotom erkennbar. In den Extremitäten sind wie in den vorigen Stadien dorsale und ventrale Bereich angefärbt (vgl. Abb. 14 C, D).

3.1.6 Das Expressionsmuster in den Stadien HH 27 bis HH 30

Totalpräparate

In diesen Stadien ist eine deutliche Färbung in der Rückenmuskulatur im Bereich zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten sowie in der Schwanzanlage zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist die Färbung auf Höhe der Hinterextremitäten deutlich schwächer bzw. ab Stadium HH 30 gar nicht mehr vorhanden. Bei der Betrachtung der Lateralansicht sind deutlich die hypaxialen Myotomextensionen angefärbt. In den Hinterextremitäten sind die Bereiche der späteren anatomischen Muskelblasteme sowie ab Stadium HH 30 verschiedene Areale zwischen den späteren Skelettelementen, vor allem an der Basis der digitalen Zwischenräume, für eine Expression positiv (vgl. Abb. 15; Abb. 16 a); Abb. 17).

Vibratomschnitte (von Stadium HH 29)

In den Vibratomschnitten ist eine deutliche Färbung in den Spinalganglien erkennbar. Außerdem ist eine Expression von *c-myc* in der Rückenmuskulatur zu sehen. In den Extremitäten sind verschiedene, abgegrenzte Areale zwischen den späteren Skelettelementen angefärbt (vgl. Abb. 16 b)).

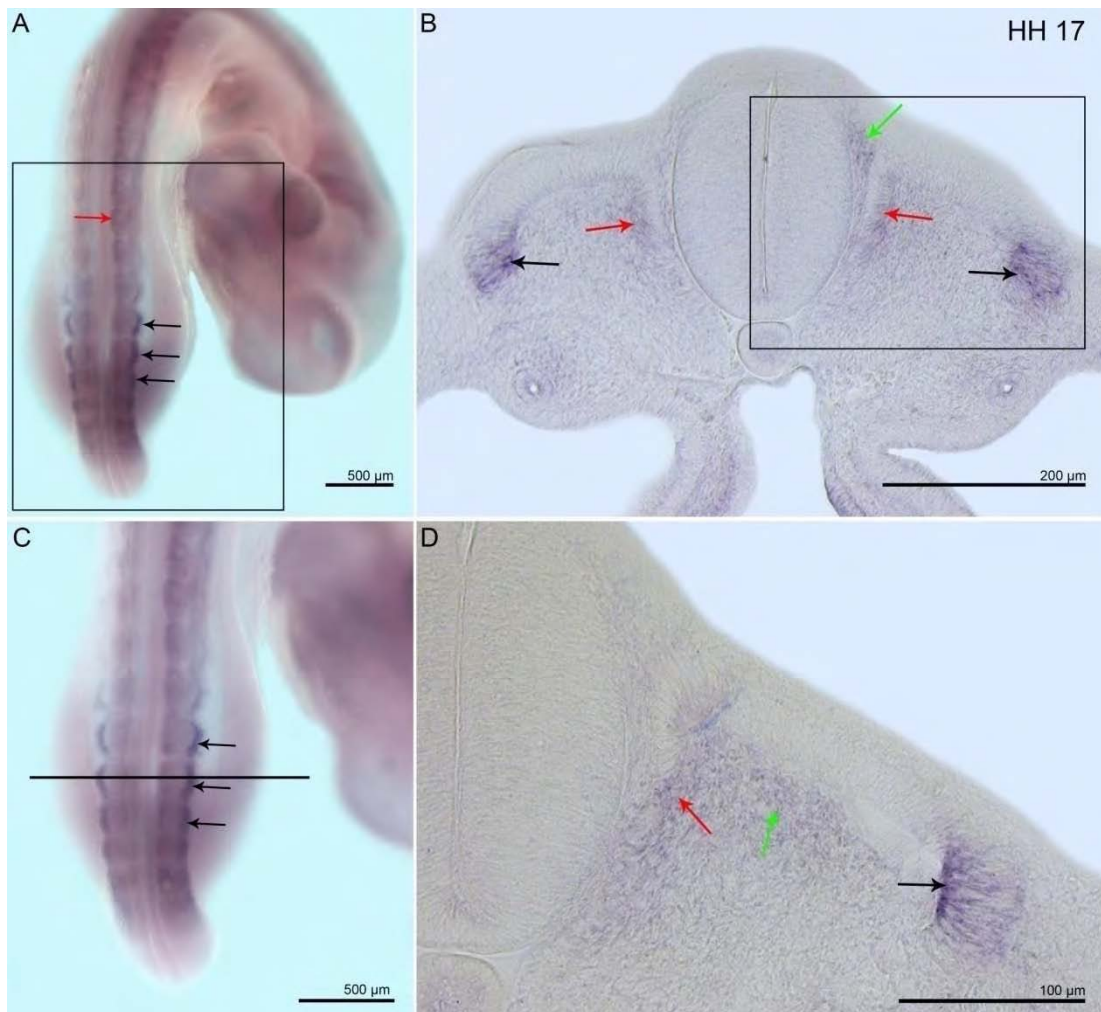


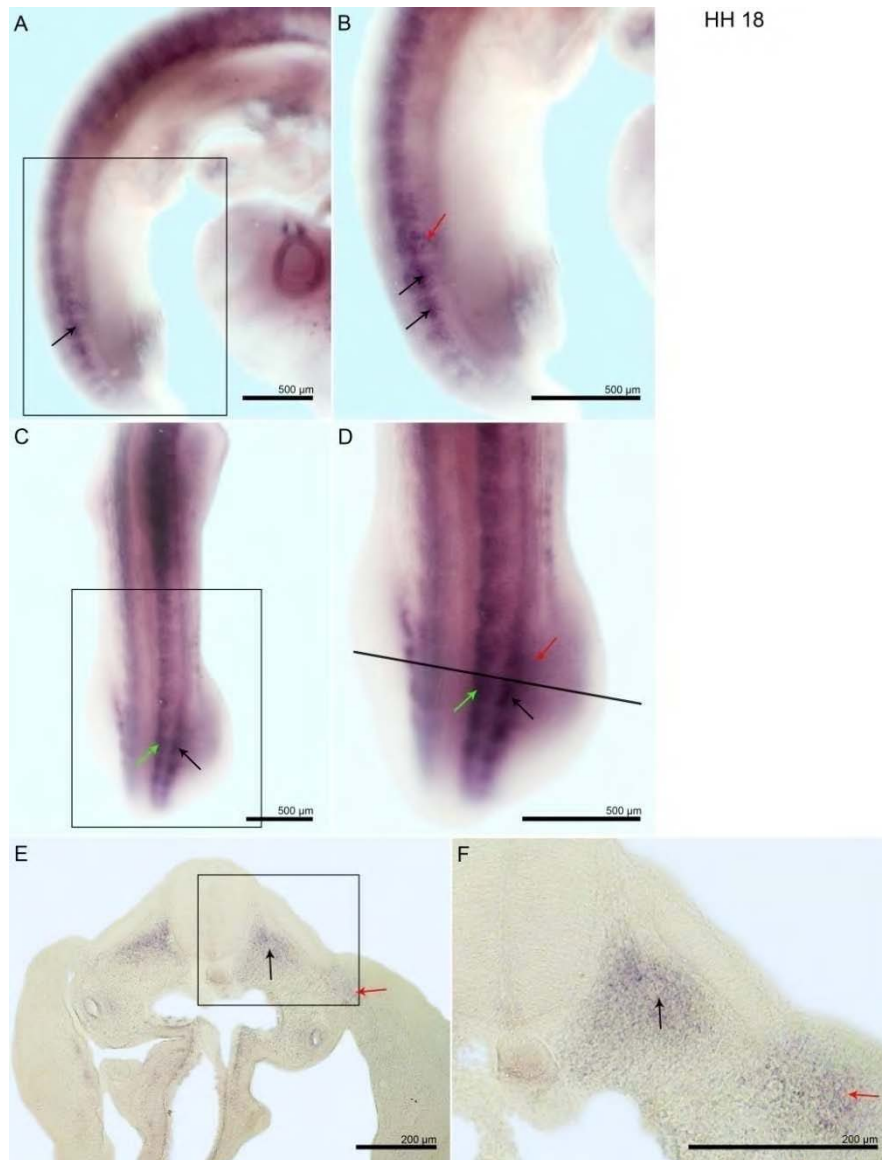
Abb. 10 Expressionsmuster im Stadium HH 17

A: Dorsalansicht eines Totalpräparates. Eine markante Expression ist in der lateralen Dermomyotomlippe auf Höhe der Hinterextremitäten (schwarze Pfeile) erkennbar. Eine geringe Färbung liegt in der medialen Dermomyotomlippe (roter Pfeil) vor.

B: Querschnitt des Embryos auf Höhe der Hinterextremitäten. Eine deutliche Expression ist in der lateralen Dermomyotomlippe (schwarze Pfeile), in den Zellen zwischen der späteren medialen Dermomyotomlippe und dem Neuralrohr (grüner Pfeil) sowie in den Zellen der späteren medialen Dermomyotomlippe (rote Pfeile) erkennbar.

C: Detailansicht von A. Deutlich erkennbar ist die Expression in der lateralen Dermomyotomlippe (schwarze Pfeile).

D: Detailansicht von B. Neben der Expression in der lateralen Dermomyotomlippe (schwarzer Pfeil) und im Sklerotom (grüner Pfeil) ist auch eine Expression in den Zellen der späteren medialen Dermomyotomlippe (roter Pfeil) sichtbar.



HH 18

Abb. 11
Expressions-
muster im
Stadium HH
18

A: Lateralansicht eines Totalpräparates. Deutlich zu erkennen ist die Expression in der lateralen Dermomyotomlippe (schwarzer Pfeil).

B: Detailansicht von A. Neben der Expression in der lateralen Dermomyotomlippe (schwarze Pfeile), ist eine Expression in den aus der lateralen Dermomyotomlippe in die Gliedmaßenanlage migrierenden Zellen (roter Pfeil) zu sehen.

C: Dorsalansicht eines Totalpräparates.

Erkennbar sind Färbungen in der lateralen Dermomyotomlippe (schwarzer Pfeil) sowie Färbungen in der medialen Dermomyotomlippe (grüner Pfeil).

D: Detailansicht von C. Hier ist neben der Expression in der lateralen Dermomyotomlippe (schwarzer Pfeil) und medialen Dermomyotomlippe (grüner Pfeil) auch eine Expression in den aus der lateralen Dermomyotomlippe in die Gliedmaßenanlage migrierenden Zellen (roter Pfeil) zu sehen.

E: Querschnitt durch den Embryo auf Höhe der Hinterextremität. Sowohl das Sklerotom (schwarzer Pfeil) als auch die aus der lateralen Dermomyotomlippe migrierenden Zellen (roter Pfeil) sind angefärbt.

F: Detailansicht von E. Gezeigt sind das Sklerotom (schwarzer Pfeil) und die aus der lateralen Dermomyotomlippe in die Gliedmaßenanlage migrierenden Zellen (roter Pfeil).

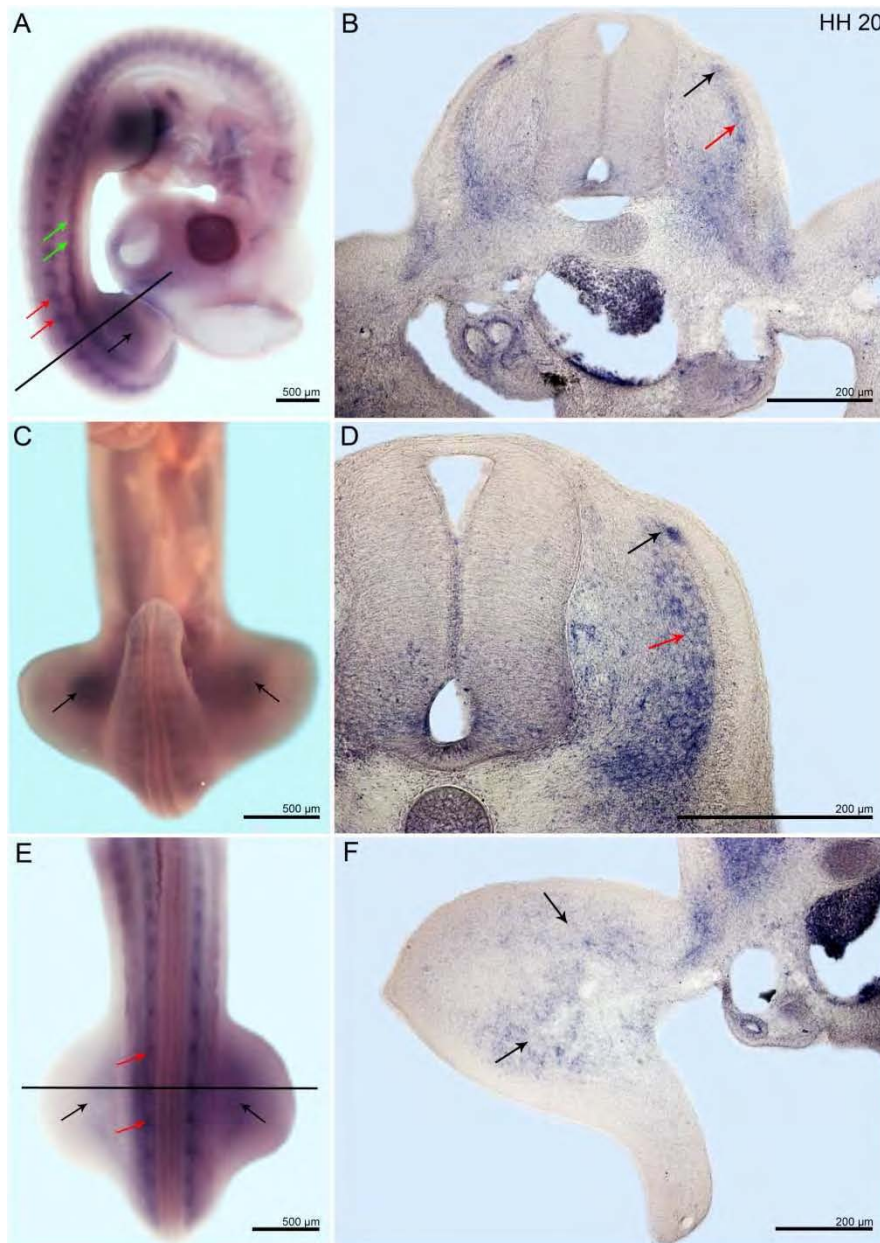


Abb. 12
Expressions-
muster im
Stadium HH
20

A: Lateralansicht eines Totalpräparates. Deutlich zu erkennen ist die Expression in der lateralen Dermomyotomlippe zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten (grüne Pfeile), in der medialen Dermomyotomlippe (rote Pfeile) und in der dorsalen Vormuskelmasse (schwarzer Pfeil).

B: Querschnitt durch den Embryo auf Höhe der Hinterextremität. Sowohl das Sklerotom (roter Pfeil) als auch die mediale Dermomyotomlippe (schwarzer

Pfeil) sind angefärbt.

C: Ventralansicht eines Totalpräparates. Erkennbar ist die Färbung in der ventralen Vormuskelmasse (schwarze Pfeile)

D: Detailansicht von B.

E: Dorsalansicht eines Totalpräparates. Zu erkennen sind eine Expression im kaudalen Rand der einzelnen Somiten (rote Pfeile) und die Expression in der dorsalen Vormuskelmasse (schwarze Pfeile)

F: Querschnitt durch den Embryo auf Höhe der Hinterextremitäten. Sowohl die dorsale als auch die ventrale Vormuskelmassen (schwarze Pfeile) sind für eine Expression positiv. Es ist noch keine deutliche Separierung der Massen erkennbar.

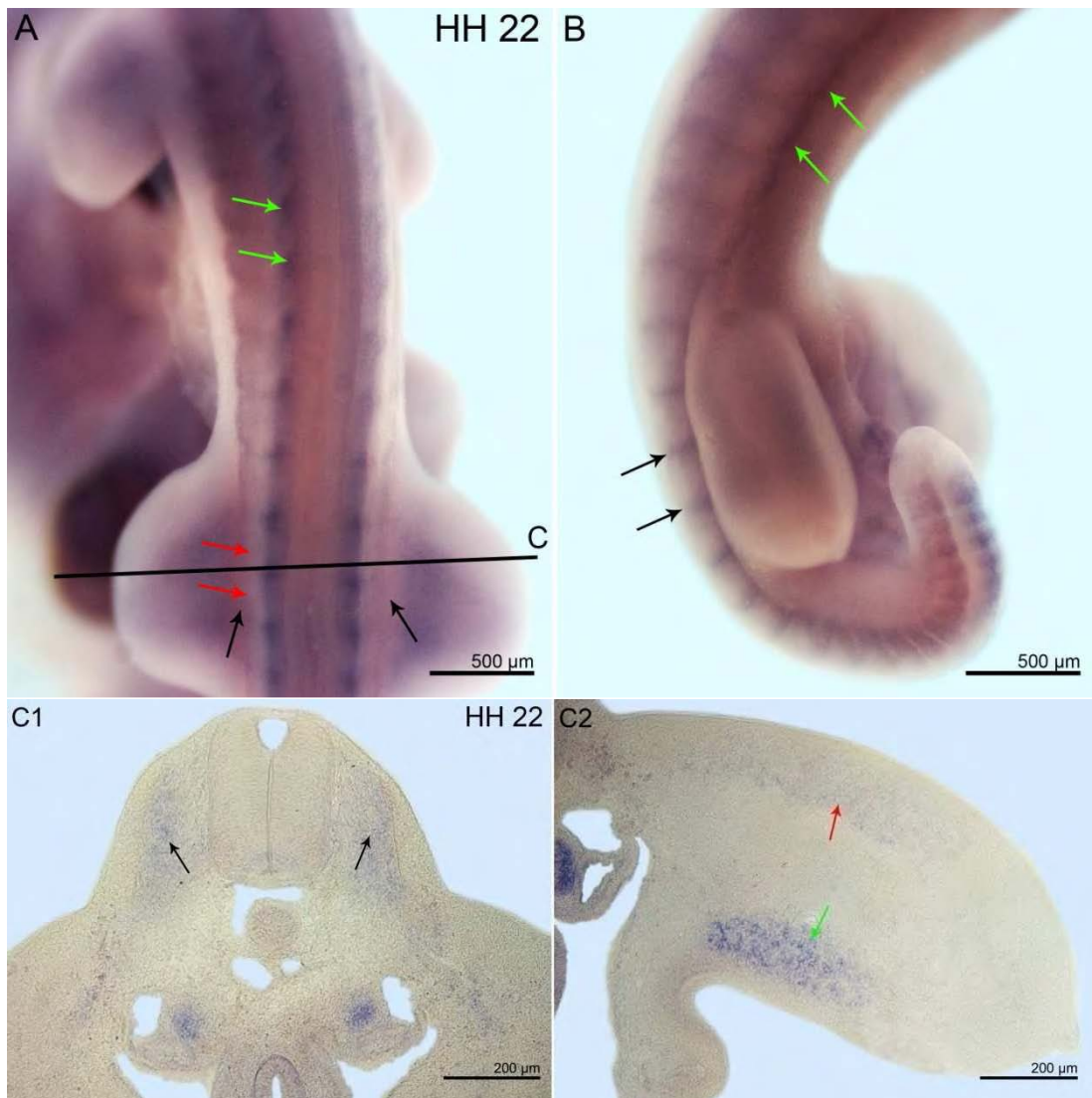


Abb. 13 a) Expressionsmuster im Stadium HH 22

A: Dorsalansicht eines Totalpräparates des Stadiums HH 22. Deutlich zu erkennen ist die Färbung im kaudalen Rand der Somiten (grüne Pfeile). Die laterale Dermomyotomlippe weist im Gegensatz zu jüngeren Stadien keine Expression mehr auf (rote Pfeile), ebenso verhält es sich mit der Strecke zwischen der lateralen Dermomyotomlippe und den Vormuskelmassen (schwarze Pfeile).

B: Lateralansicht eines Totalpräparates des Stadiums HH 22. Deutlich zu erkennen ist die Färbung zwischen den Somiten (schwarze Pfeile) und in der lateralen Dermomyotomlippe zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten (grüne Pfeile).

C1: Querschnitt durch einen Embryo des Stadiums HH 22 auf Höhe der Hinterextremität. Zu sehen ist eine Expression im Sklerotom (schwarze Pfeile).

C2: Querschnitt durch einen Embryo des Stadiums HH 22 auf Höhe der Hinterextremität. Sowohl die dorsale Vormuskelmasse (roter Pfeil) als auch die ventrale Vormuskelmasse (grüner Pfeil) sind angefärbt. Eine Separierung der beiden Massen ist deutlich erkennbar.



Abb. 13 b) Expressionsmuster im Stadium HH 22 und HH 23

A: Dorsalansicht eines Totalpräparates des Stadiums HH 22. Deutlich zu erkennen ist die diffuse Färbung in der zungenförmige Expression in der dorsalen Vormuskelmasse (schwarze Pfeile).

B: Dorsalansicht eines Totalpräparates des Stadiums HH 23. Deutlich zu erkennen ist die Färbung im Randbereich der zungenförmige Expression in der dorsalen Vormuskelmasse (schwarze Pfeile).

C: Ventralansicht eines Totalpräparates des Stadiums HH 22. Die ventrale Vormuskelmasse ist deutlich angefärbt (schwarze Pfeile).

D: Ventralansicht eines Totalpräparates des Stadiums HH 23. Hier ist ebenfalls die ventrale Vormuskelmasse stark angefärbt (schwarze Pfeile).

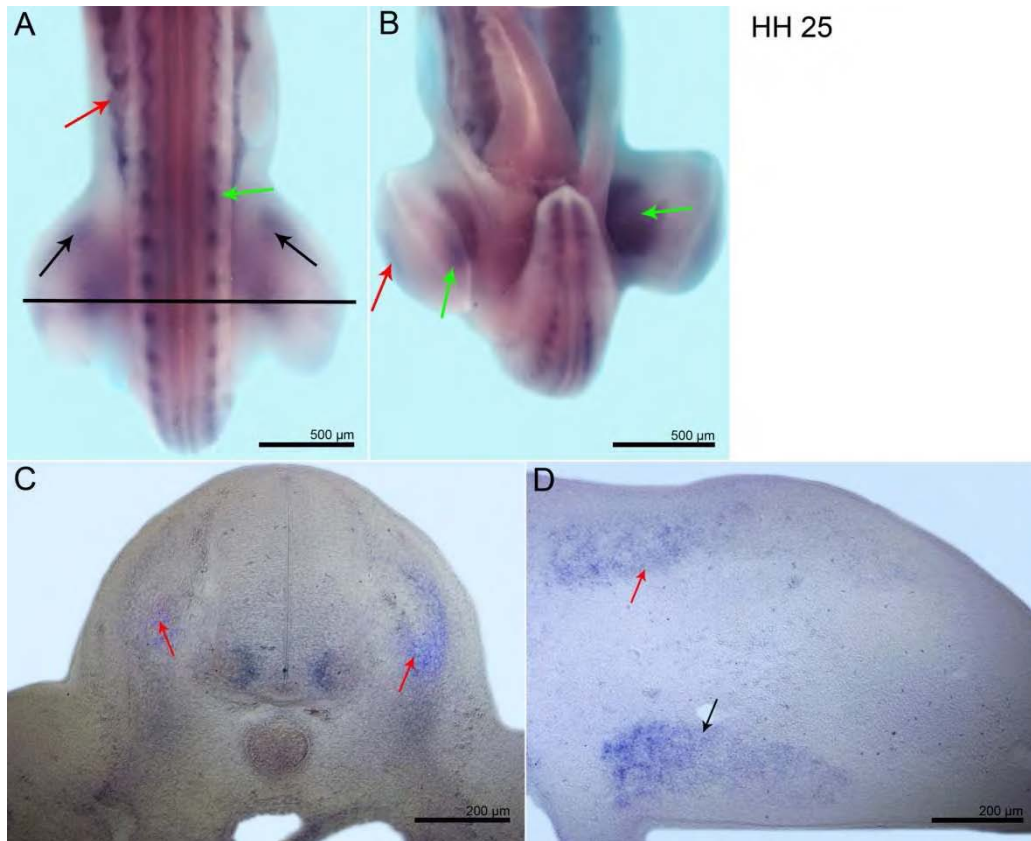


Abb. 14 Expressionsmuster im Stadium HH 25

A: Dorsalansicht eines Totalpräparates. Eine deutliche Expression ist dorsal zwischen den einzelnen Somiten (grüner Pfeil) und in der lateralen Dermomyotomlippe zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten (roter Pfeil) erkennbar. In den Hinterextremitäten sind die Vorläufer der späteren anatomischen Muskelblasteme (schwarze Pfeile) angefärbt.

B: Ventralansicht eines Totalpräparates. Hier sind sowohl ventral (grüne Pfeile) als auch dorsal (roter Pfeil) Vormuskelmassen erkennbar.

C: Querschnitt durch den Embryo auf Höhe der Hinterextremitäten. Eine Expression ist im Sklerotom (rote Pfeile) erkennbar.

D: Querschnitt durch den Embryo auf Höhe der Hinterextremitäten. Expressionsdomänen stellen sowohl die dorsale (roter Pfeil) als auch die ventrale Vormuskelmasse (schwarzer Pfeil) der Extremität dar.

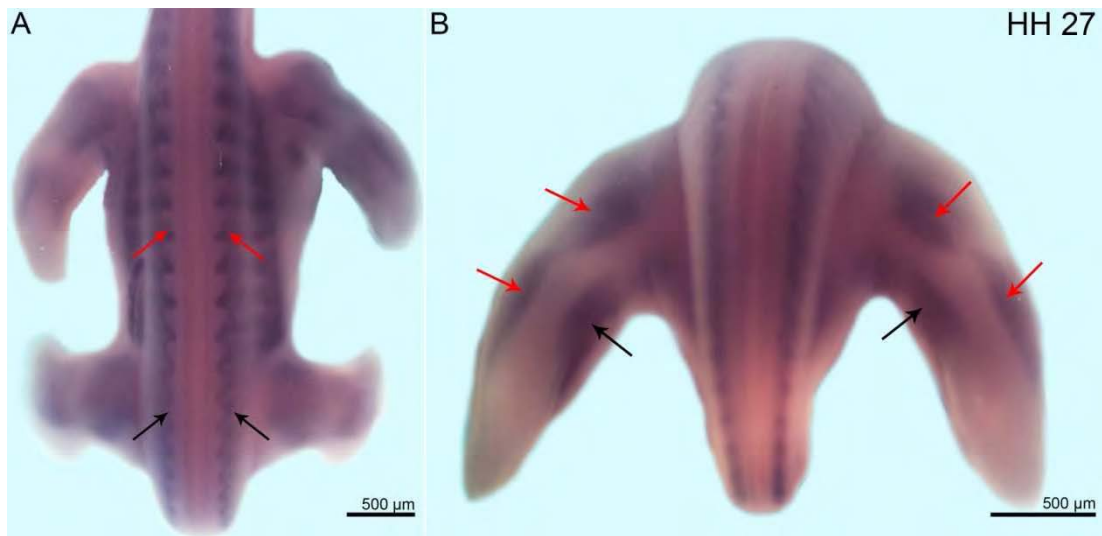


Abb. 15 Expressionsmuster im Stadium HH 27

A: Dorsalansicht eines Totalpräparates. Eine deutliche Expression ist dorsal in der Muskulatur (rote Pfeile) in dem Bereich zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten erkennbar. Nicht mehr ganz so deutlich ist diese Expression auf Höhe der Hinterextremitäten (schwarze Pfeile)

B: Kaudalansicht eines Totalpräparates. Hier sind verschiedene Muskelgruppen ventral (schwarze Pfeile) und dorsal (rote Pfeile) erkennbar.

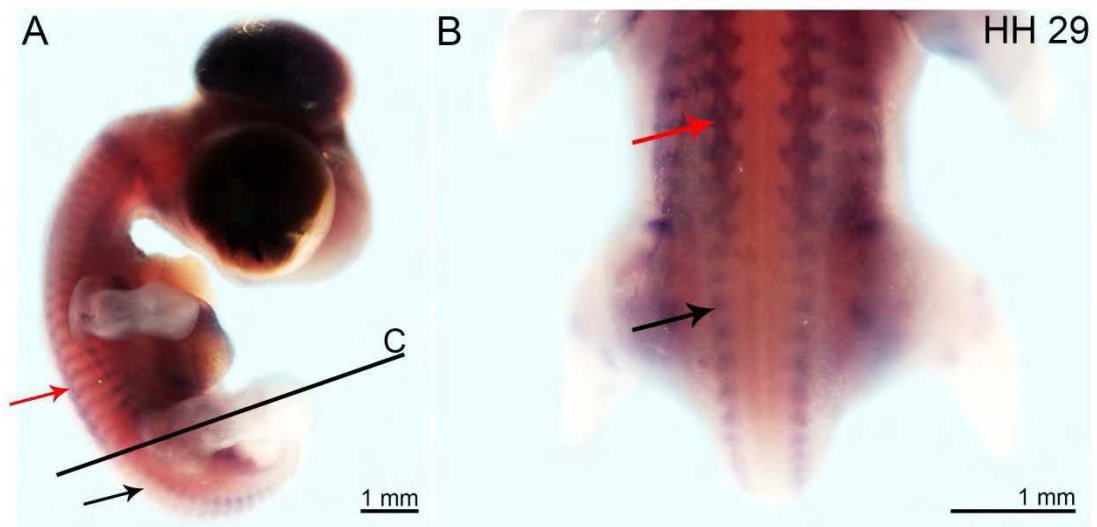


Abb. 16 a) Expressionsmuster im Stadium HH 29

A: Lateralansicht eines Totalpräparates. Eine deutliche Expression ist in den hypaxialen Myotomextensionen (roter Pfeil) in dem Bereich zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten erkennbar. Nicht mehr ganz so deutlich ist diese Expression auf Höhe der Hinterextremitäten (schwarzer Pfeil)

B: Dorsalansicht eines Totalpräparates. Hier ist ebenso eine geringere Expression in der Muskulatur auf Höhe der Hinterextremitäten (schwarzer Pfeil) als im Bereich zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten (roter Pfeil) erkennbar.

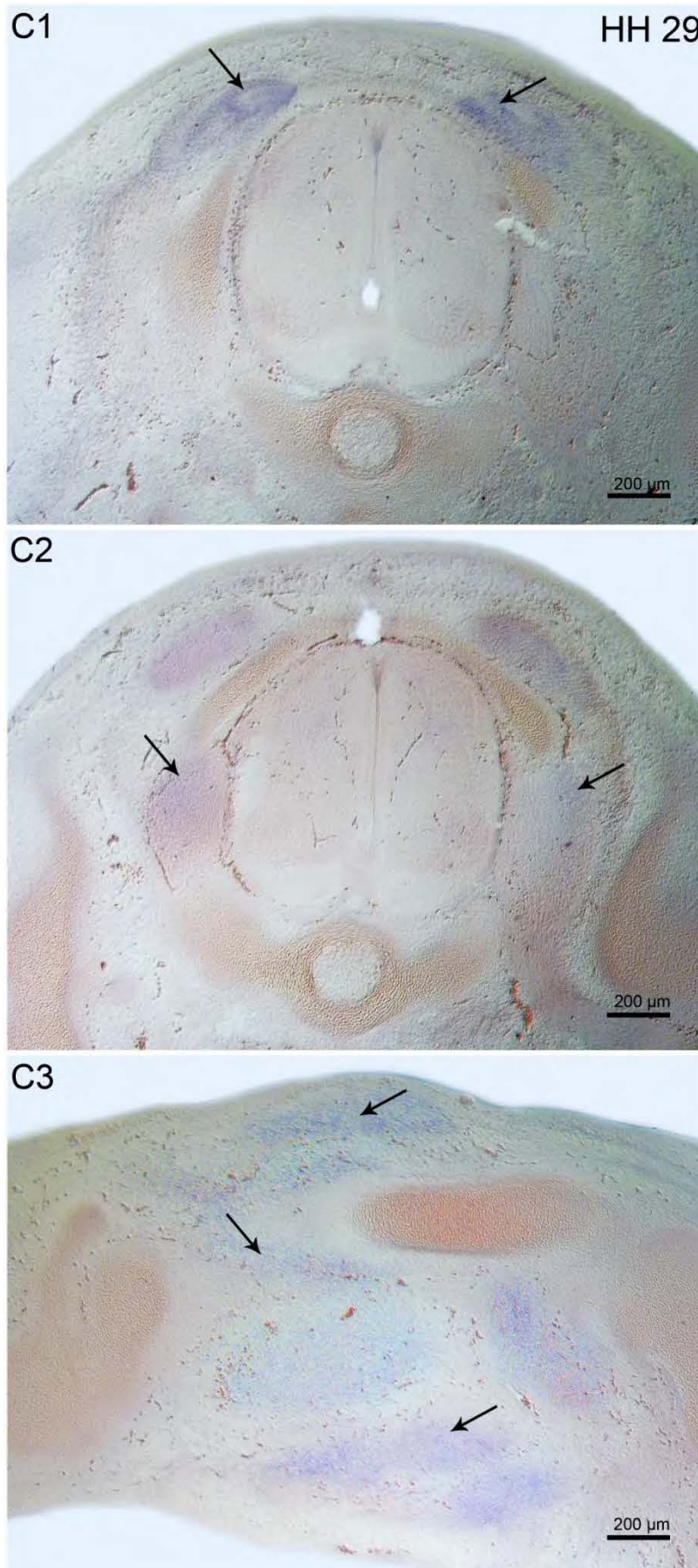


Abb. 16 b)
Expressionsmuster
im Stadium HH 29

C1: Querschnitt durch den Embryo auf Höhe der Hinterextremitäten. Zu erkennen ist eine Expression in der Rückenmuskulatur (schwarze Pfeile)

C2: Querschnitt durch den Embryo auf Höhe der Hinterextremitäten. Eine deutliche Expression ist in den Spinalganglien (schwarze Pfeile) zu sehen.

C3: Querschnitt durch den Embryo auf Höhe der Hinterextremitäten. Verschiedene Areale zwischen den späteren Skelettelementen sind für eine Expression von *c-myc* positiv.

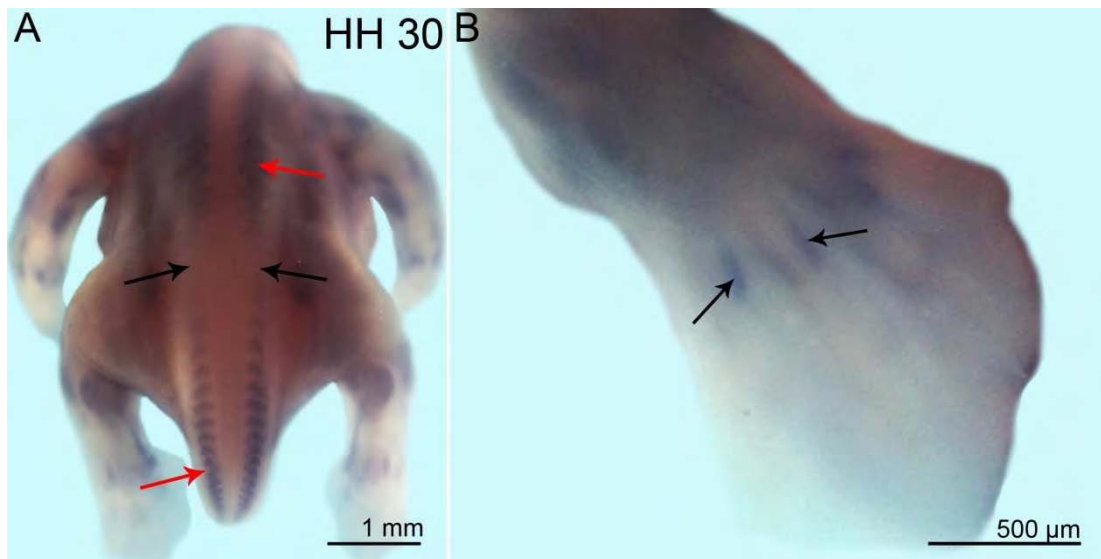


Abb. 17 Expressionsmuster im Stadium HH 30

A: Dorsalansicht eines Totalpräparates. Eine deutliche Expression ist in der Muskulatur in dem Bereich zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten und in der Schwanzanlage erkennbar (rote Pfeile). Nicht mehr vorhanden ist diese Expression auf Höhe der Hinterextremitäten (schwarze Pfeile).

B: Ventrolateralansicht einer Hinterextremität. Hier ist die Basis der Zwischenzehenbereiche zwischen den späteren Skelettelementen angefärbt (schwarze Pfeile).

3.2 Knockdownexperimente von *c-myc*

Nach der Elektroporation der Hühnerembryonen mit unterschiedlichen Plasmiden wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden Hühnerembryonen mit dem scrambled shRNA Vektor transfiziert und anschließend hybridisiert (vgl. Abb. 18).

3.2.1 Nachweis des Knockdowns im Hühnerembryo mit Hilfe von In-Situ Hybridisierung

Um einen Knockdowneffekt nachweisen zu können, wurden die Somiten im Bereich zwischen den Vorder- und den Hinterextremitäten elektroporiert. Zur In-Situ Hybridisierung der elektroporierten Embryonen mit der *c-myc*-Sonde wurden zwei verschiedene Vektoren verwendet, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten.

In-Situ Hybridisierung mit der *c-myc*-Sonde in einem pSP64 Vektor

Die mit einer Mischung aus den Plasmiden H1 677 und H1 1374 transfizierten Hühnerembryonen wurden mit der *c-myc*-Sonde in einem pSP64 Vektor hybridisiert.

Als Ergebnis ist eine Überexpression in der lateralen Dermomyotomlippe der elektroporierten Somiten zu erkennen (vgl. Abb. 19).

In-Situ Hybridisierung mit der *c-myc*-Sonde in einem pDrive Vektor

Die Elektroporation erfolgte vor allem mit einer Mischung aus den Plasmiden H1 677 und H1 1374. Die In-Situ Hybridisierung wurde mit der *c-myc*-Sonde in einem pDrive Vektor durchgeführt.

Als Ergebnis kann eine verringerte Expression in den elektroporierten Somiten verzeichnet werden (vgl. Abb. 20).

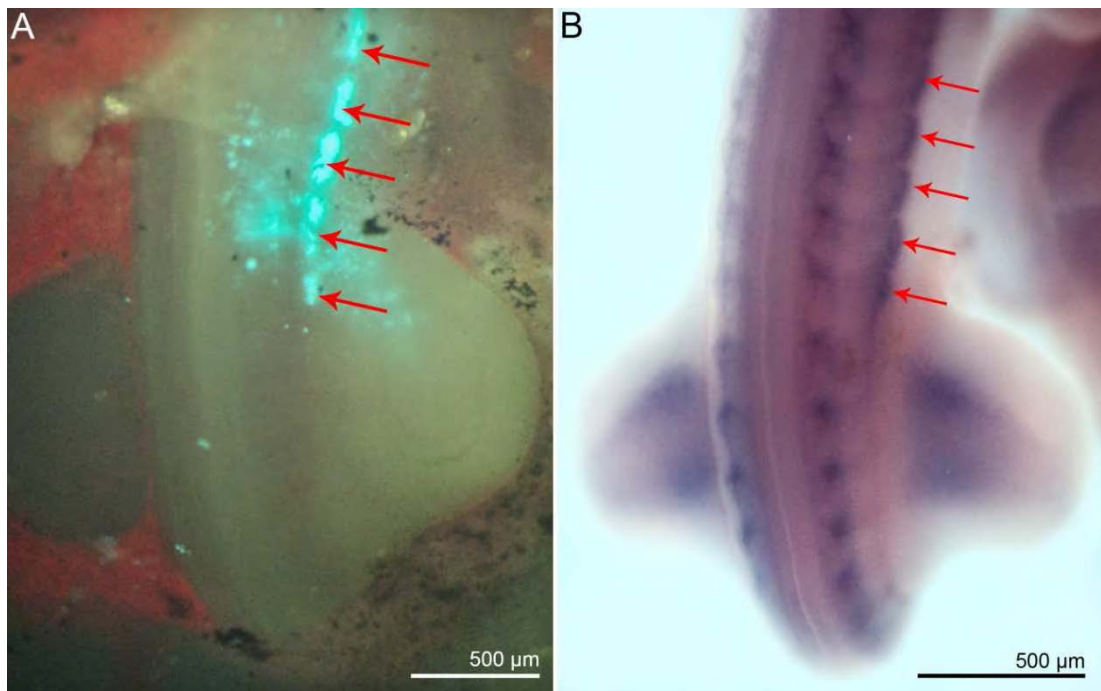


Abb. 18 In-Situ Hybridisierung mit dem pDrive Vektor nach Transfektion mit dem scrambled shRNA Vektor (Negativkontrolle)

A: Dorsalansicht eines Totalpräparates nach Elektroporation unter dem Fluoreszenzmikroskop. Deutlich ist die Fluoreszenz in der lateralen Dermomyotomlippe der Somiten auf der rechten Seite des Neuralrohrs zu erkennen (rote Pfeile).

B: Dorsalansicht desselben Embryos nach der In-Situ Hybridisierung mit der *c-myc*-Sonde in dem pDrive Vektor. Die laterale Dermomyotomlippe der rechten Somiten (rote Pfeile) ist deutlich angefärbt.

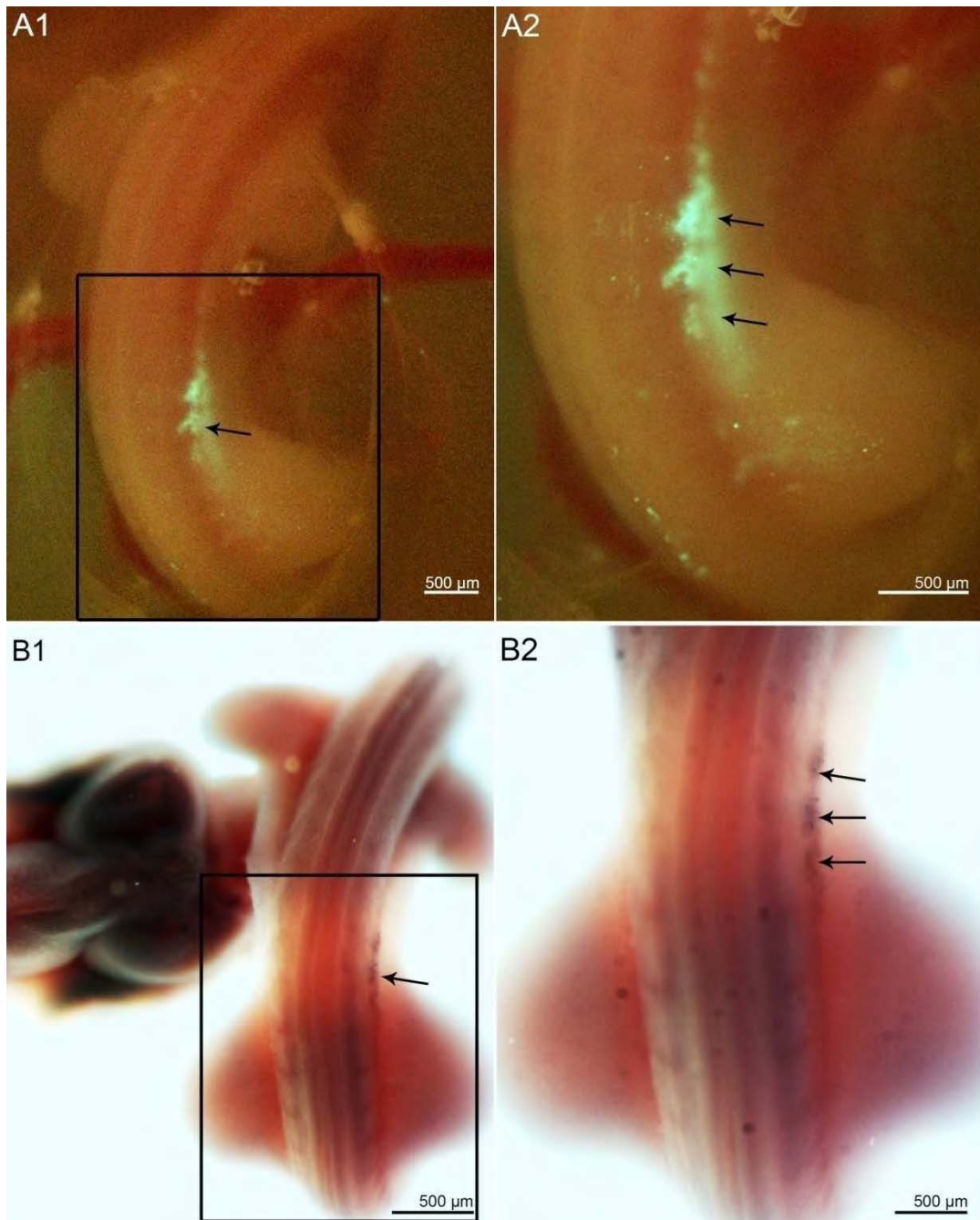


Abb. 19 In-Situ Hybridisierung mit dem pSP64 Vektor nach Transfektion mit den Plasmiden H1 677 und H1 1374

A1: Dorsolateralansicht eines Totalpräparates nach Elektroporation unter dem Fluoreszenzmikroskop. Deutlich ist die Fluoreszenz in der lateralen Dermomyotomlippe von drei Somiten auf der rechten Seite des Neuralrohrs zu erkennen (schwarzer Pfeil).

A2: Detailansicht von A1.

B1: Dorsalansicht desselben Embryos nach der In-Situ Hybridisierung mit der *c-myc*-Sonde in dem pSP64 Vektor. Die laterale Dermomyotomlippe dieser drei Somiten (schwarze Pfeile) ist deutlich stärker gefärbt, als die der anderen.

B2: Detailansicht von B1. Deutlich ist eine stärkere Expression in der lateralen Dermomyotomlippe der drei elektroporierten Somiten (schwarze Pfeile) als in den anderen Somiten erkennbar.

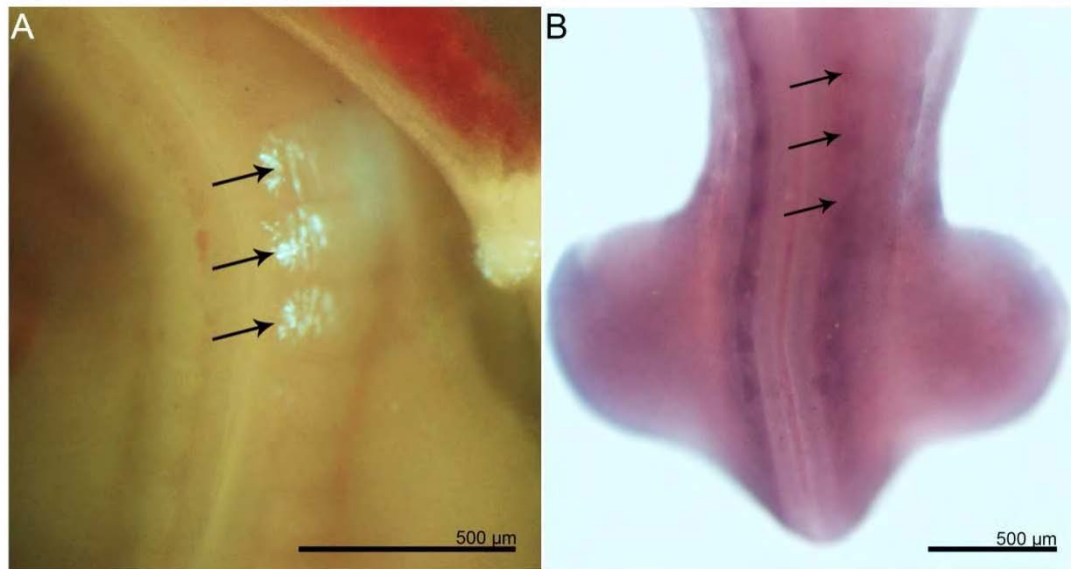


Abb. 20 In-Situ Hybridisierung mit dem pDrive Vektor nach Transfektion mit den Plasmiden H1 677 und H1 1374

A: Dorsalansicht eines Totalpräparates nach Elektroporation unter dem Fluoreszenzmikroskop. Deutlich ist die Fluoreszenz in der medialen Dermomyotomlippe der Somiten auf der rechten Seite des Neuralrohrs zu erkennen (schwarze Pfeile).

B: Dorsalansicht desselben Embryos nach der In-Situ Hybridisierung mit der *c-myc*-Sonde in dem pDrive Vektor. Die mediale Dermomyotomlippe der rechten Somiten (schwarze Pfeile) ist deutlich schwächer gefärbt als die der linken Somiten.

3.2.2 Untersuchung des Migrationsverhaltens der mit shRNA-Konstrukten transfizierten Zellen im Hühnerembryo

Um das Migrationsverhalten der Zellen beurteilen zu können, erfolgte die Elektroporation in die laterale Dermomyotomlippe der Somiten auf Höhe der Hinterextremität. Es wurden Embryonen der Stadien HH 17 bis HH 17+ verwendet, da im Stadium HH 16 noch nicht genug Somiten auf Hinterextremitätenhöhe gebildet werden und bei HH 18 die Migration der Zellen aus der lateralen Dermomyotomlippe bereits erfolgt ist. Nach 24 bis 36 h wurde der Elektroporationserfolg am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und das Migrationsverhalten der elektroporierten Zellen beurteilt (vgl. Abb. 21). Die Beurteilung erfolgte anhand der zurückgelegten Strecke der migrierenden Zellen.

Bei 46 von 50 mit shRNA-Konstrukten transfizierten Embryonen legen die Zellen dieselbe Strecke zurück wie bei der Negativkontrolle mit scrambled shRNA (vgl. Tab. 2; Abb. 22, Tab. 3). Auffällig allerdings ist, dass bei der Negativkontrolle keine Fluoreszenzfärbung in den Somiten erkennbar ist, während bei den mit dem Knockdownkonstrukt behandelten Embryonen eine deutliche Färbung in der lateralen Dermomyotomlippe vorhanden ist.

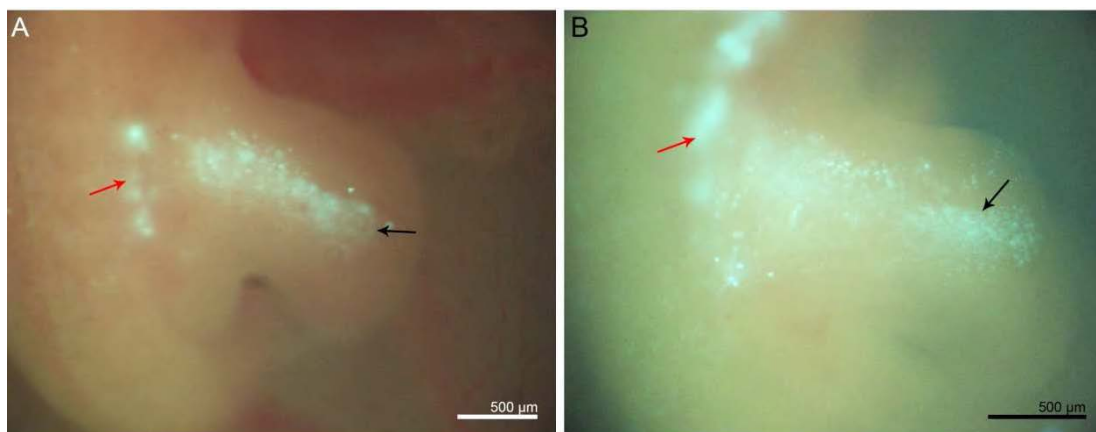
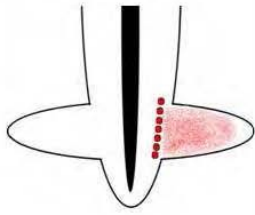
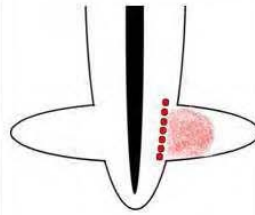


Abb. 21 Migrationsverhalten der Prämyoblasten nach Transfektion mit dem Knockdownkonstrukt

A und B: Dorsolateransicht eines Totalpräparates nach Elektroporation unter dem Fluoreszenzmikroskop. Zu sehen sind einerseits elektroporierte Zellen in der lateralen Dermomyotomlippe (roter Pfeil) und andererseits in die Extremitätenanlage migrierende Zellen (schwarzer Pfeil).

	EP der VLL auf Höhe der Hinterextremität	Migration bis in die Extremitätenspitze bei gleichzeitigem Zurückbleiben von Zellen in der VLL 	Migration bis in die Mitte der Extremität bei gleichzeitigem Zurückbleiben von Zellen in der VLL 
Anzahl der Embryonen	50	46	4
prozentualer Anteil		92,00%	8,00%

Tab. 2 Migrationsverhalten der Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe nach Transfektion mit den Plasmiden H1 677 und H1 1374.

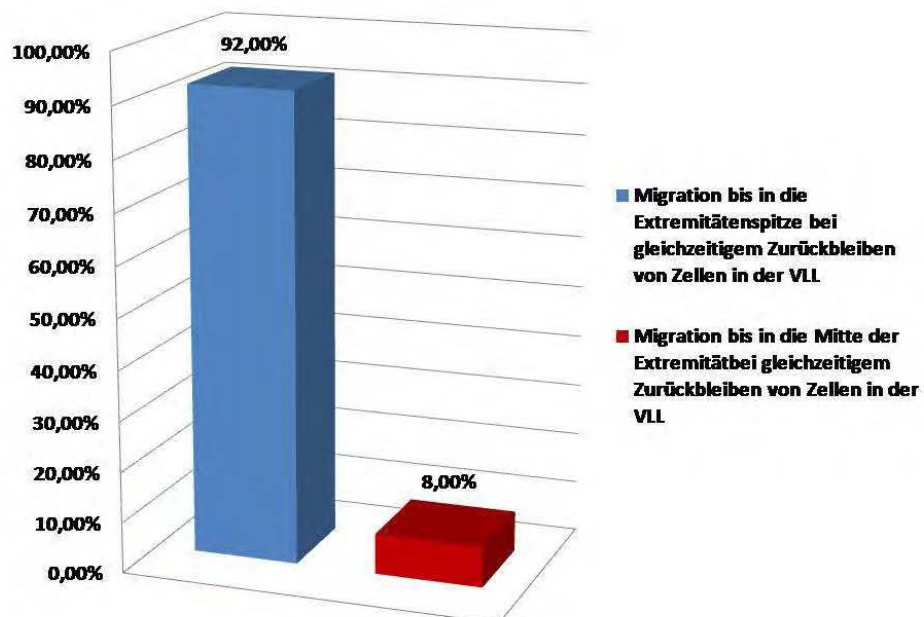
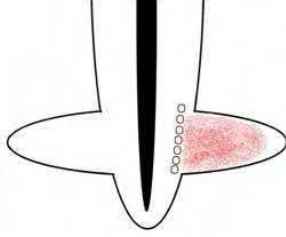


Abb. 22 Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Tab. 3.

	EP der VLL auf Höhe der Hinterextremität	Migration bis in die Extremitätenspitze ohne in der VLL zurückbleibende Zellen 
Anzahl der Embryonen	17	17
prozentualer Anteil		100,00%

Tab. 3 Migrationsverhalten der Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe nach Transfektion mit dem scrambled shRNA Vektor (Negativkontrolle).

Um zu überprüfen, ob nicht nur dieselbe Strecke zurückgelegt wird, sondern ob auch die Anzahl der migrierenden Zellen mit denen der Negativkontrolle übereinstimmt, wurden Vibratomschnitte angefertigt und eine Antikörperfärbung gegen EGFP durchgeführt. Damit ist es möglich, alle mit shRNA- oder scrambled shRNA-Konstrukten transfizierten Zellen sichtbar zu machen und durch Zählen der Zellen einen direkten Vergleich zu erhalten (vgl. Abb. 23 und Abb. 24). Für diesen Vergleich wurden Embryonen verwendet, bei denen dieselbe Anzahl von Somiten elektroporiert wurden.

In den mit den shRNA-Konstrukten behandelten Embryonen fällt auf, dass die Zellen zwar genauso weit migrieren wie die der Negativkontrolle, es aber nach einer Auszählung der migrierten Zellen, einen deutlichen Unterschied in der Anzahl gibt. So enthält die dorsale Vormuskelfmasse im Durchschnitt nur 57% und die ventrale Vormuskelfmasse nur 80% der normalerweise üblichen Anzahl an Zellen.

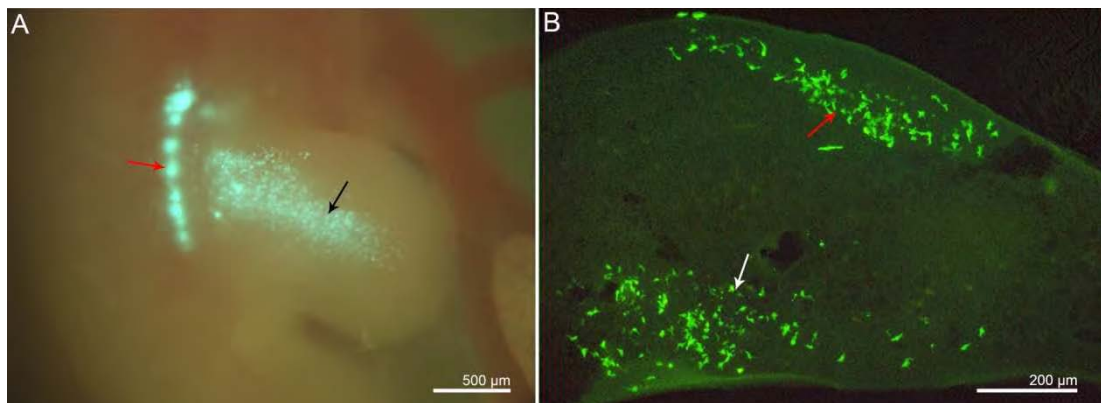


Abb. 23 Migrationsverhalten der Prämyoblasten nach Elektroporation mit dem Knockdownkonstrukt und Fluoreszenz-Immunhistochemie

A: Dorsolateralansicht eines Totalpräparates nach Elektroporation unter dem Fluoreszenzmikroskop. Zu erkennen ist deutlich die Fluoreszenz in Zellen der lateralen Dermomyotomlippe (roter Pfeil) sowie in den migrierenden Zellen in der Hinterextremität (schwarzer Pfeil).

B: Fluoreszenz-Immunhistochemie des Embryos nach Querschnitt auf Höhe der Hinterextremitäten. Eine deutliche Fluoreszenz ist in den Zellen der dorsalen Vormuskelfmasse (roter Pfeil) und in den Zellen der ventralen Vormuskelfmasse (weißer Pfeil) zu sehen.

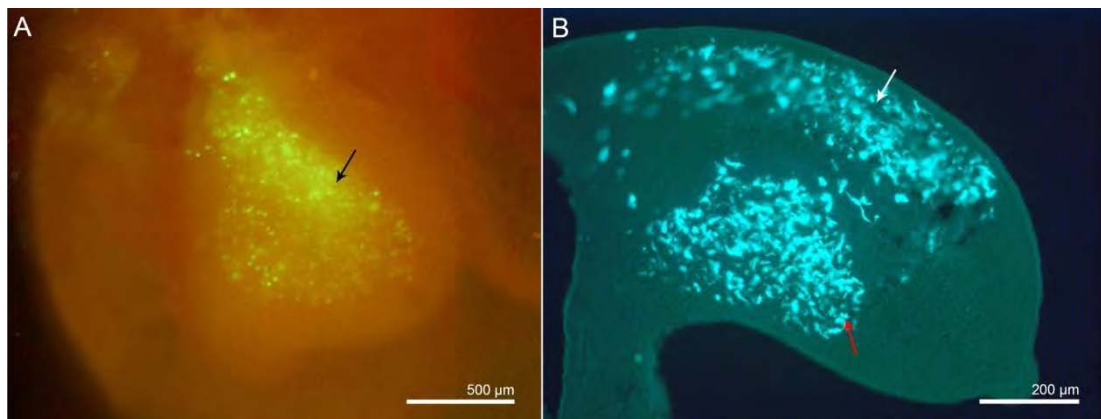


Abb. 24 Migrationsverhalten der Prämyoblasten nach Elektroporation mit scrambled shRNA (Negativkontrolle) und Fluoreszenz-Immunhistochemie

A: Dorsolateralansicht eines Totalpräparates nach Elektroporation unter dem Fluoreszenzmikroskop. Zu erkennen ist deutlich die Fluoreszenz in migrierenden Zellen in der Hinterextremität (schwarzer Pfeil).

B: Fluoreszenz-Immunhistochemie des Embryos nach Querschnitt auf Höhe der Hinterextremitäten. Eine deutliche Fluoreszenz ist in den Zellen der dorsalen Vormuskelfmasse (weißer Pfeil) und in den Zellen der ventralen Vormuskelfmasse (roter Pfeil) zu sehen.

**DIE EXPRESSION VON C-MYC WÄHREND
DER AUSWANDERUNG VON PRÄMYOBLASTEN
IN DIE GLIEDMAßENANLAGE DES VOGELEMBRYOS
UND DIE VALIDIERUNG VON KONSTRUKTEN
ZUR FUNKTIONSANALYSE DURCH RNAI**

INES KATRIN HELLWIG



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

3.2.3 Untersuchung der Auswirkungen des Knockdowns auf Pax3

Um die Auswirkungen eines Knockdowns von *c-myc* auf Pax3 untersuchen zu können, wurden zunächst Hühnerembryonen mit den Plasmiden H1 677 und H1 1374 transfiziert. Nach 24 bis 36 h wurde der Elektroporationserfolg am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und die Embryonen fixiert. Anschließend erfolgte eine In-Situ Hybridisierung mit der *Pax3*-Sonde.

Bei der Betrachtung der mit der *Pax3* Sonde hybridisierten Embryonen fällt auf, dass im Vergleich zu der Kontrollseite in der elektroporierten Seite eine geringere Expression von *Pax3* vorhanden ist. Die Stelle der verringerten Expression ist identisch mit der Stelle, an der unter dem Fluoreszenzmikroskop elektroporierte Zellen zu erkennen sind (vgl. Abb. 25).

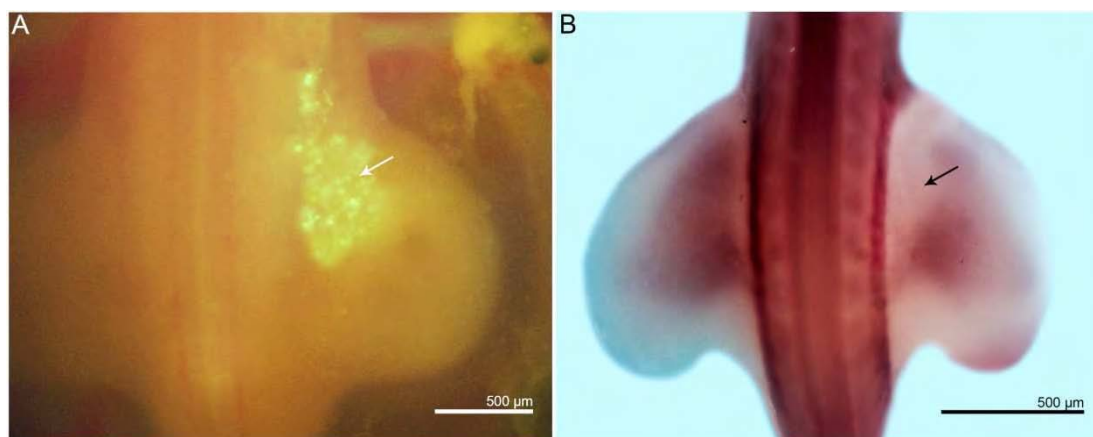


Abb. 25 In-Situ Hybridisierung mit der Pax3-Sonde nach Transfektion mit den Plasmiden H1 677 und H1 1374

A: Dorsalansicht eines Totalpräparates nach Elektroporation unter dem Fluoreszenzmikroskop. Zu erkennen ist deutlich die Fluoreszenz in migrierenden Zellen in der Hinterextremität (weißer Pfeil).
B: Dorsalansicht desselben Embryos nach der In-Situ Hybridisierung mit der *Pax3*-Sonde. Die laterale Dermomyotomlippe der rechten Somiten sowie Teile der rechten Hinterextremität (schwarzer Pfeil) sind deutlich schwächer gefärbt als die der Kontrollseite.

4. Diskussion

4.1 Das Expressionsmuster von *c-myc* in den Somiten auf Höhe der Hinterextremitäten sowie in den Gliedmaßenanlagen

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Expressionsmuster von *c-myc* in den Somiten auf Höhe der Hinterextremitäten sowie in den Gliedmaßenanlagen analysiert und soll nun mit dem Expressionsmuster von *Lbx1* und *Pax3* verglichen werden. Eine bereits existierende Arbeit von Jaffredo et al. aus dem Jahr 1989 beschreibt das Expressionsverhalten von *c-myc* im Vogelembryo fast ausschließlich auf Proteinebene und das Expressionsmuster in den Somiten und Gliedmaßenanlagen stellt nur einen kurz gefassten Bestandteil dieser Arbeit dar.

Da die Expressionsanalyse von *c-myc* aber nicht nur Aufschluss über die Funktion von c-Myc während der Auswanderung der Prämyoblasten in die Gliedmaßenanlage des Vogelembryos geben soll, sondern vor allem die Grundlage der später folgenden Knockdownexperimente darstellt, war es notwendig, eine ausführliche Analyse auf mRNA-Ebene anzufertigen.

Die Expression von *c-myc* zeigt sich bereits in den neu gebildeten Somiten. Auffallend allerdings ist, dass diese komplett angefärbt sind, während die älteren Somiten nur im Randbereich für eine Expression positiv sind. Bei Betrachtung der Somiten im Querschnitt fällt auf, dass sowohl die mediale und laterale Dermomyotomlippe als auch das Sklerotom Expressionsdomänen darstellen. In Embryonen, bei denen sich bereits Gliedmaßenanlagen ausgebildet haben, ist eine Färbung in migrierenden Prämyoblasten und später auch in den Vormuskelmassen vorhanden, während die Expression in der lateralen Dermomyotomlippe stetig abnimmt. Zusätzlich zu den Somiten und den daraus entstehenden Derivaten ist eine Expression von *c-myc* in den Spinalganglien erkennbar.

Vergleicht man dieses Expressionsmuster mit der Arbeit von Jaffredo et al., dann fällt auf, dass eine Expression von *c-myc* auf Proteinebene im Myotom, die sich nach der Entwicklung der Vormuskelmassen stark verringert, nachweisbar ist. (Jaffredo et al., 1989). Auf mRNA-Ebene ist keine Expression erkennbar. Eine Erklärung hierfür

könnte in der verwendeten Methode zur Expressionsanalyse des c-Myc Proteins liegen. Jaffredo et al. verwendeten zur Detektion des Proteins einen polyklonalen Antikörper gegen ein von Bakterien produziertes Polypeptid, welches strukturell dem Exon 3 des c-Myc Proteins entspricht. Da sich die einzelnen Mitglieder der Myc-Familie strukturell sehr ähneln, könnte es zu einer Kreuzreaktion gekommen sein. Vorstellbar wäre dies z.B. bei *N-myc*, da dieses in vielen embryonalen Geweben, unter anderem auch dem Myotom exprimiert wird (Sawai et al., 1990). Außerdem beschreiben Jaffredo et al., dass das Expressionssignal auf Proteinebene im Sklerotom genauso stark ist, wie das im Dermatome und in den restlichen embryonalen Geweben. Auf mRNA-Ebene zeigt sich allerdings eine deutlich stärkere Expression im Sklerotome.

Ein Vergleich des Expressionsmusters von *c-myc* mit dem von *Lbx1* und *Pax3* (vgl. Abb. 26) wurde speziell für die Somiten mit migrierenden Prämyoblasten sowie die Vormuskelmassen angefertigt. Alle drei Gene werden stark in der lateralen Dermomyotomlippe exprimiert. Die mediale Dermomyotomlippe ist bereits ab Stadium HH 17 für eine Expression von *c-myc* positiv, während sie bei *Pax3* erst später (HH 21) eine Färbung aufweist. *Lbx1*, welches einen Marker für die aus der lateralen Dermomyotomlippe migrierende Prämyoblasten darstellt, wird zu keinem Zeitpunkt in der medialen Dermomyotomlippe exprimiert. In den migrierenden Prämyoblasten ist sowohl eine Expression von *c-myc* als auch von *Pax3* und *Lbx1* vorhanden. Aber auch in den Vormuskelmassen werden alle drei Gene exprimiert.

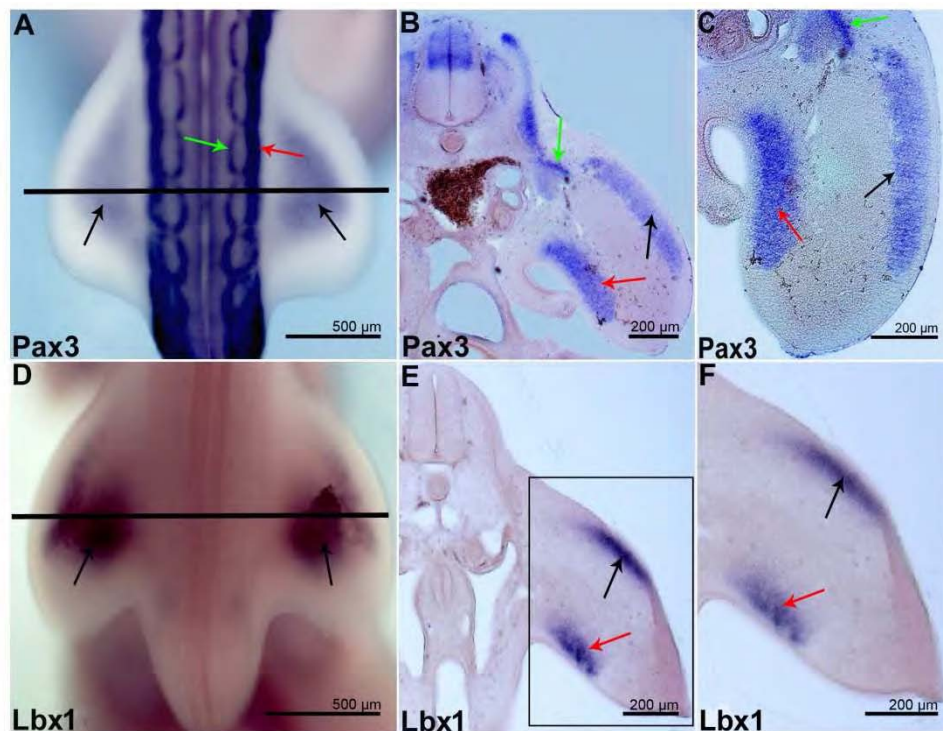


Abb. 26 Expressionsmuster von Pax3 und Lbx1

A: Dorsalansicht eines Totalpräparates des Stadiums HH 21. Zu sehen ist eine deutliche Expression von *Pax3* in der lateralen Dermomyotomlippe (roter Pfeil), in der medialen Dermomyotomlippe (grüner Pfeil) sowie in der dorsalen Vormuskelfmasse (schwarze Pfeile).

B: Querschnitt des Embryos aus A auf Höhe der Hinterextremitäten. Zu erkennen ist eine starke Färbung in der lateralen Dermomyotomlippe (grüner Pfeil) sowie in der dorsalen (schwarzer Pfeil) und ventralen Vormuskelfmasse (roter Pfeil).

C: Detailansicht von B.

D: Dorsalansicht eines Totalpräparates des Stadiums HH 23. Zu sehen ist eine deutliche Expression von *Lbx1* in der dorsalen Vormuskelfmasse (schwarze Pfeile).

E: Querschnitt des Embryos aus D auf Höhe der Hinterextremitäten. Zu erkennen ist eine starke Färbung in der dorsalen (schwarzer Pfeil) und ventralen Vormuskelfmasse (roter Pfeil).

F: Detailansicht von E.

Die Funktionen von Pax3 und Lbx1 sind sehr gut erforscht. So ist bekannt, dass Pax3 die Expression des Tyrosinkinaserzeptors *c-met* im Dermomyotom kontrolliert (Epstein et al., 1996). Durch eine Bindung von SF/HGF an c-Met wird eine Ablösung der Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe möglich. Die Expression von *Lbx1* ist ebenfalls abhängig von Pax3 (Mennerich et al., 1998) und ist für die Migration von myogenen Zellen essentiell. So kommt es in *Lbx1*-mutierten Mäusen zu einer veränderten Migration der Prämyoblasten in die Extremität, wobei die dorsalen Abschnitte stärker betroffen sind als die ventralen. Dies lässt darauf schließen, dass Lbx1 der Erkennung und Interpretation von dirigierenden

Signalmolekülen dient (Brohmann et al., 2000). Außerdem wird Lbx1 und Pax3 eine bedeutende Rolle in der Stimulation der Proliferation von migrierenden Zellen zugeschrieben (Mennerich und Braun, 2001).

C-Myc können ebenfalls einige Funktionen bei der Extremitätenentwicklung zugewiesen werden. Bekannt ist z. B., dass c-Myc, wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben, essentiell für die Zellproliferation ist. Auch bei der Osteosynthese übernimmt c-Myc wichtige Aufgaben. So kommt es bei einer Überexpression von *c-myc* im Hühnerembryo zu einer Verkürzung der skeletalen Elemente und zur Bildung zusätzlicher Knorpelstrukturen, indem die Chondrozytenreifung verzögert wird. Keine Auswirkung hat die Überexpression in diesem Fall auf die myogene Differenzierung, was anhand von In-Situ Hybridisierungen mit Myo D gezeigt wurde (Piedra et al., 2002). Dies steht im Gegensatz zu älteren, in vitro durchgeführten Forschungsergebnissen, in denen festgestellt wurde, dass durch c-Myc eine Differenzierung durch MyoD negativ reguliert wird (Miner und Wold, 1991). Eine weitere erforschte Funktion von c-Myc ist die physiologische Aktivität bei der Apoptose, die im Normalfall durch Wachstumsfaktoren oder Überlebenssignale der Zelle gehemmt wird (Amati und Land, 1994). Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Funktion von c-Myc, Apoptose zu induzieren, steht die Verbindung zwischen c-Myc und Apoptose während der Embryonalentwicklung der Vogelextremitäten. Die Entfernung des AER (apical ectodermal ridge), des distalen Extremitätenrandes, in welchem Wachstumsfaktoren wie vor allem FGFs (Fibroblast growth factors) gebildet werden, führt zu einer Verringerung der Menge an Wachstumsfaktoren. Als Folge kommt es zu einer massiven Apoptose im darunterliegenden Mesoderm. Allerdings kann dort kein Anstieg der *c-myc*-Expression festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass es keine Korrelation zwischen einer erhöhten *c-myc*-Expression und dem programmierten Zelltod in der sich entwickelnden Vogelextremität gibt (Ros et al., 1995). Weiterhin ist bekannt, dass eine ektopische Überexpression von *c-myc* in murinen Neuroblastomzellen zu einer erhöhten Expression von *Pax3* führt (Harris et al., 2002). Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass c-Myc auch im Hühnerembryo regulierend auf die Expression von *Pax3* einwirkt.

Ungeklärt ist allerdings noch, welche Rolle c-Myc bei der Migration der Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe und der Myogenese spielt. Ist es hierbei nur für die Proliferation der Zellen zuständig oder hat es auch eine Funktion bei der Zellmotilität? Bekannt ist, dass c-Myc zu entgegengesetzten Effekten in der Zellmotilität in menschlichen Brust- und Zervixkarzinomzellen führen kann. Zurückzuführen ist dieser Effekt auf unterschiedliche Zielgene in verschiedenen Zellen (Cappellen et al., 2007). Eine weitere ungeklärte Frage ist, wie die Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe in die Gliedmaßenanlage gelangen. Geschieht dies durch Proliferation, Zellmotilität oder eine Mischung aus beidem? Um auf diese Frage näher eingehen zu können, muss zunächst geklärt werden, ob c-Myc in aviären Prämyoblasten nur einen Effekt auf die Proliferation oder aber auch auf die Zellmotilität erzielt und ob es somit dafür geeignet ist, den Prozess der Auswanderung der Prämyoblasten zu untersuchen. Für diesen Zweck ist ein Bestandteil dieser Arbeit die Validierung von shRNA-Konstrukten zum Knockdown von *c-myc*.

4.2 Knockdownnachweis von *c-myc* im Hühnerembryo

Nach der In-Situ Hybridisierung mit der Sonde in einem pSP64 Vektor ist scheinbar eine Überexpression von *c-myc* in den mit shRNA-Konstrukten transfizierten Embryonen erkennbar (vgl. Kap. 3.2, Abb. 19). Da dies ein unerwartetes, aber sehr interessantes Ergebnis darstellt, soll die Ursache hier weiter erläutert werden. Eine Überexpression, verursacht durch ein shRNA-Konstrukt, ist sehr unwahrscheinlich. Um eine erklärbare Ursache zu finden, wurde das in dem pSP64 Vektor verwendete Insert bei Promega sequenziert. Zur Linearisierung des Inserts wird bei diesem Vektor als Restriktionsendonuklease PVUII verwendet. Das linearisierte Insert besteht demnach nicht nur aus der *c-myc*-Sonde, die sich zwischen zwei EcoRI-Schnittstellen (51 und 557) befindet, sondern auch noch aus den Basenpaaren zwischen der zweiten EcoRI- (557) und der PVUII-Schnittstelle (vgl. Kap. 7.2, Abb. 27). Die Sonde selbst hat eine Länge von 484 bp, während das Reststück 180 bp lang ist.

Bei näherer Betrachtung und Sequenzierung des Inserts und des zu transfizierenden shRNA-Plasmids fällt auf, dass das 180 bp lange Reststück zu 179 bp des shRNA-Plasmids komplementär ist (vgl. Kap. 7.2, Abb. 28). Dies kann zu einer Bindung des Inserts an das shRNA-Plasmid und somit bei der In-Situ Hybridisierung zu einer starken Färbung in den Zellen, die das Plasmid enthalten, führen. Dadurch entsteht der Eindruck einer Überexpression.

Um dieses Problem zu lösen und einen Knockdownnachweis zu erhalten, wurde das Insert in einen anderen Vektor, den pDrive Vektor, ligiert. Die *c-myc*-Sonde befindet sich hier ebenfalls zwischen zwei EcoRI-Schnittstellen. Allerdings wird bei diesem Vektor eine andere Restriktionsendonuklease, HindIII, verwendet, wodurch ein kürzeres Reststück als bei dem pSP64 Vektor entsteht (vgl. Kap. 7.2, Abb. 29). Das Reststück hat hier dann eine Länge von nur 16 bp, was eine stabile Bindung an den shRNA Vektor so gut wie unmöglich macht.

Nach der In-Situ Hybridisierung der mit den H1 677 und H1 1374 shRNA-Konstrukten elektroporierten Embryonen mit dem pDrive Vektor ist dann auch keine Überexpression mehr erkennbar. Die elektroporierte Seite der Embryonen zeigt eine schwächere Färbung als die Kontrollseite (vgl. Kap. 3.2, Abb. 20). Um auszuschließen, dass dies ein unerwünschter Nebeneffekt des Vorgangs der Elektroporation ist, wurden Negativkontrollen mit scrambled shRNA-Konstrukten angefertigt und ebenfalls hybridisiert. Diese zeigen ein physiologisches Expressionsmuster sowohl auf der elektroporierten als auch auf der unmanipulierten Seite (vgl. Kap. 3.2, Abb. 18). Diese Ergebnisse lassen auf einen funktionierenden Knockdown schließen. Die Konstrukte H1 677 und H1 1374 können somit zur Funktionsanalyse von c-Myc verwendet werden.

4.3 Das Migrationsverhalten der mit shRNA-Konstrukten transfizierten Zellen

Um auszuschließen, dass c-Myc in den myogenen Vorläuferzellen nicht nur eine Rolle bei der Proliferation, sondern auch bei der Zellmotilität spielt (vgl. Kap. 4.1), wurde die Elektroporation mit den vorher hergestellten und getesteten shRNA-Konstrukten auf Höhe der Hinterextremitäten durchgeführt. Anschließend wurden

mit Hilfe der Fluoreszenz-Immunhistochemie die mit den Plasmiden transfizierten Zellen sichtbar gemacht (vgl. Kap. 3.2, Abb. 23). Beim Vergleich der so entstandenen Bilder mit denen der Negativkontrolle (vgl. Abb. 24) fällt auf, dass bei einem Knockdown von *c-myc* vermehrt Zellen in der lateralen Dermomyotomlippe verbleiben. Dasselbe Phänomen ist bei den Totalpräparaten unter dem Fluoreszenzmikroskop zu sehen. Aus diesem Ergebnis ist zunächst nicht zu erkennen, ob dies nun auf eine verringerte Proliferation oder eine verringerte Zellmotilität zurückzuführen ist. Bei genauerer Betrachtung der Vibratomschnitte und der Totalpräparate fällt allerdings auf, dass die Zellen, die ausgewandert sind, die gleiche Wegstrecke zurückgelegt haben wie die Zellen in der Negativkontrolle. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Motilität der Prämyoblasten durch den Knockdown nicht beeinflusst wurde und somit c-Myc in den Prämyoblasten nur eine Funktion in der Proliferation übernimmt. Anzumerken ist hier, dass bei vier von fünfzig mit dem shRNA-Konstrukt elektroporierten Embryonen, die Zellen eine geringere Wegstrecke zurücklegten als in der Negativkontrolle. Da diese Embryonen außerdem auch noch eine Verkürzung der manipulierten Gliedmaße aufweisen, ist dies mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Verletzung der AER (apical ectodermal ridge) durch eine Elektrode und dadurch eine verringerte Menge an Wachstumsfaktoren, wie die FGFs, zurückzuführen. Da eine ektopische Expression der Mitglieder der FGF-Familie zu einer verstärkten Migration von Prämyoblasten führt (Webb et al., 1997), kann daraus gefolgert werden, dass bei einer verringerten Expression die Migrationsrate abnimmt.

Um die Ursache des Zurückbleibens von Prämyoblasten in der lateralen Dermomyotomlippe zu finden, wurden die Auswirkungen eines Knockdowns von *c-myc* auf die Expression von *Pax3* untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass es zu einer Herunterregulierung von *Pax3* kommt (vgl. Abb. 25).

Um aus diesen Ergebnissen nun weitere Schlüsse auf das Migrationsverhalten der Prämyoblasten ziehen zu können, soll zunächst auf bereits bestehende Erkenntnisse und Vermutungen verwiesen werden. So ist bereits bekannt, dass sowohl *Pax3* als auch *Lbx1* stimulierend auf die Proliferation von migrierenden Zellen einwirken (Mennerich und Braun, 2001). *Pax3*-mutierte Mäuse zeichnen sich durch das Fehlen von migrierenden Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe aus, was auf

eine Störung in der epithelio-mesenchymalen Transition zurückzuführen ist (Schäfer und Braun, 1999). Ebenso verhält es sich bei Mäusen, denen c-Met bzw. SF/HGF fehlt. Ihnen fehlt die komplette Muskulatur, die aus den myogenen Vorläuferzellen aus der lateralen Dermomyotomlippe entsteht (Bladt et al., 1995; Maina et al., 1996). *SF/HGF* wird in der Nähe der Somiten, die die Vorläuferzellen bilden, exprimiert und führt mit Hilfe einer Aktivierung von c-Met zur Ablösung dieser Zellen aus der lateralen Dermomyotomlippe (Bladt et al., 1995; Dietrich et al., 1999). Außerdem hält es die Prämyoblasten in einem undifferenzierten Zustand und lenkt sie zu ihrer korrekten Endposition (Scaal et al., 1999; Dietrich et al., 1999). Kontrolliert wird die Expression von *SF/HGF* durch die FGFs aus der AER (Scaal et al., 1999). Eine ektopische Expression von *SF/HGF* führt zu einer Emigration von Zellen aus der lateralen Dermomyotomlippe an den Stellen, von denen aus normalerweise keine Zellen emigrieren (Brand-Saberi et al., 1996; Heymann et al., 1996).

Auch bekannt ist, dass *Lbx1*-mutierten Mäusen die Muskulatur in der Hinterextremität, bis auf ein paar verstreute Myozyten, fehlt (Schäfer und Braun, 1999). In weiterführenden Untersuchungen wurde festgestellt, dass den Mutanten in den Hinterextremitäten die Extensoren vollständig fehlen, während die Flexoren nur in ihrer Größe reduziert sind (Brohmann et al., 2000). *Lbx1* spielt einerseits eine wichtige Rolle in der Proliferation der migrierenden Prämyoblasten (Mennerich und Braun, 2001) und andererseits ist es von Bedeutung zur Expression von signalerkennenden Molekülen (Brohmann et al., 2000). Dies lässt aufgrund der unterschiedlichen Muskelausbildung in den Knockout-Mäusen die Vermutung zu, dass der dorsale und der ventrale Zellstrom aus Prämyoblasten unterschiedliche Signale nutzen (Dietrich et al., 1999; Brohmann et al., 2000).

Ebenfalls eine wichtige Rolle in der Migration von Prämyoblasten kann CXCR4 und seinem Liganden SDF1 (stromal derived factor) zugeschrieben werden. Eine Expression von *CXCR4* in den Prämyoblasten ist allerdings erst ab dem Zeitpunkt vorhanden, an dem diese die Gliedmaßenanlage erreicht haben und bleibt auch in den Vormuskelmassen erhalten (Yusuf et al., 2005). Die exprimierenden Zellen stellen eine Unterpopulation von Pax3-positiven Zellen dar (Vasyutina et al., 2005). *SDF1*, welcher Chemotaxis und Zellmigration induziert, wird in den Prämyoblasten korrespondierend zu *CXCR4* exprimiert (Murdoch, 2000; Rehimi et al., 2008). Bei

einer Inhibition von CXCR4 verringert sich die Migrationsrate der Prämyoblasten, wodurch weniger Zellen die Vormuskelmassenanlage erreichen. Gleichzeitig kann eine verringerte myogene Differenzierung und eine erhöhte Endothelzellbildung beobachtet werden (Yusuf et al., 2006).

Bei der Betrachtung der oben beschriebenen Ergebnisse des Knockdowns von *c-myc* wird die Vermutung verstärkt, dass sowohl die Zellmotilität als auch die Proliferation eine Rolle in der Auswanderung der Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe spielen. So fällt auf, dass viele Zellen sich nicht aus der lateralen Dermomyotomlippe ablösen, was auf eine geringere Proliferationsrate zurückzuführen sein kann. Eine weitere Ursache ist in der Herunterregulierung von *Pax3*, bedingt durch den Knockdown, zu sehen (vgl. Abb. 25). Da *Pax3* wiederum regulierend auf die Expression von *c-met* einwirkt, kommt es zu einer Störung in der epithelio-mesenchymalen Transition (Epstein et al., 1996; Schäfer und Braun, 1999). Außerdem kommt es durch die Herunterregulierung von *Pax3* zu einer Herunterregulierung der Expression von *Lbx1*, da dieses ebenfalls von *Pax3* kontrolliert wird (Mennerich et al., 1998). Für eine verringerte Expression von *Lbx1* spricht auch, dass in den vorliegenden Ergebnissen die Migration in die dorsale Vormuskelmasse stärker verringert ist als die Migration in die ventrale Vormuskelmasse, was den Forschungsergebnissen zu den *Lbx1* Knockout-Mäusen von Brohmann et al. aus dem Jahr 2000 ähnelt. Eine weitere Möglichkeit für das Zurückbleiben von Prämyoblasten in der lateralen Dermomyotomlippe könnte ein vermehrt auftretender Zelltod aufgrund des Vorgangs der Elektroporation sein.

Da nicht alle Zellen in der lateralen Dermomyotomlippe verbleiben, sondern einige die übliche Wegstrecke zurücklegen, lässt dies vermuten, dass diese durch Zellmotilität bedingt migrieren. Um sich zunächst von der lateralen Dermomyotomlippe lösen zu können, setzt dies voraus, dass weiterhin eine gewisse Menge an *c-met* exprimiert wird. Diese Vermutung deckt sich mit den Forschungsergebnissen von Mennerich et al. aus dem Jahr 1998, in denen gezeigt wurde, dass die Expression von *c-met* in *Pax3*-mutierten Mäusen zwar stark verringert ist, aber nicht vollständig fehlt.

Ausgehend von einem Vorhandensein von c-Met – basierend auf den Forschungsergebnissen von Mennerich et al. aus dem Jahr 1998 – kann eine Migration, induziert durch SF/HGF, vermutet werden. Ebenso könnte nach dem Ablösevorgang CXCR4/SDF1 stimulierend auf die Migration einwirken.

Um das Migrationsverhalten der Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe endgültig erklären zu können, müssen noch weitere Forschungen durchgeführt werden. Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen könnte eine Folgearbeit einen Proliferations- und einen Apoptosetest sowie die Untersuchung der Auswirkungen eines Knockdowns von *c-myc* auf CXCR4 zum Inhalt haben. Zur Absicherung der oben genannten Ergebnisse könnte auch noch eine Analyse der Effekte eines Knockdowns von *c-myc* auf die Expression von *Lbx1* und *c-met* in Betracht gezogen werden.

5. Zusammenfassung / Summary

Die Gliedmaßenentwicklung ist Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Allerdings ist noch nicht vollständig geklärt, ob die Auswanderung der Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe in die Gliedmaßenanlage durch Proliferation, Motilität oder einer Mischung aus beidem zustande kommt.

Da *c-Myc* eine essentielle Rolle in der Zellproliferation spielt, eignet es sich gut dazu, mit Hilfe der Methode der RNAi diese Fragestellung zu beantworten. Als Grundlage hierfür wurde zunächst die Expression von *c-myc* während der Auswanderung der Prämyoblasten in die Gliedmaßenanlagen des Vogelembryos in den Stadien HH 17 bis HH 30 untersucht. Das Ergebnis ist eine deutliche Expression im Sklerotom, in der medialen und der lateralen Dermomyotomlippe, in den migrierenden Prämyoblasten und den Vormuskelmassen.

Im nächsten Schritt wurden die zuvor hergestellten shRNA-Konstrukte zum Knockdown von *c-myc* an Hühnerembryonen getestet. Eine Mischung aus den Plasmiden H1 677 und H1 1374 führte zu einem Silencing-Effekt. Mit diesen Konstrukten wird somit die Möglichkeit geschaffen, die Fragestellung der Auswanderungsmethode der Prämyoblasten in weiteren Forschungsarbeiten zu klären.

Um einen Ausblick auf mögliche weitere Vorgehensweisen in Folgearbeiten zu geben, wurde sowohl das Migrationsverhalten der mit dem shRNA-Konstrukt transfizierten Zellen, als auch die Auswirkungen eines Knockdowns von *c-myc* auf die Expression von *Pax3* durch erste Versuche beurteilt. Ein großer Teil der transfizierten Zellen bleibt in der lateralen Dermomyotomlippe zurück, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine verringerte Proliferationsrate der Zellen zurückzuführen ist. Eine weitere Ursache stellt die Herunterregulierung der Expression von *Pax3* dar, was wiederum zu einer negativen Expressionskontrolle von *c-met* und *Lbx1* führt. Der andere Teil der transfizierten Zellen migriert die physiologische Strecke in die Gliedmaßenanlagen, um dort die Vormuskelmassen zu bilden. Dies erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit durch Motilität der Zellen aufgrund von CXCR4/SDF1 sowie einer noch gering vorhandenen Expression von *c-met*.

Limb development has been addressed in numerous scientific investigations. But it is not completely clear yet, if the migration of myogenic precursor cells - out of the lateral lip of the dermomyotome into the limb bud - is a consequence of proliferation, motility or a mixture of both.

Because of the essential function of c-Myc in proliferation there is a good chance to answer this question by means of the method of RNA interference. As a base it has been necessary to analyze the expression pattern of *c-myc* during the migration of the myogenic precursor cells out of the lateral lip of the dermomyotome into the limb bud in chicken embryo at the stages HH 17 to HH 30. A clear expression can be observed in the sklerotome, in the medial lip and lateral lip of the dermomyotome, in the migrating myogenic precursor cells and in the premuscle masses.

The next step was the testing of the shRNA constructs, which had been designed for a downregulation of *c-myc*. A mixture of the H1 677 and the H1 1374 plasmids caused a silencing effect. With these constructs it will be possible in further research studies to get an answer to the question how the myogenic precursor cells migrate into the limb bud.

To give an outlook on possible further procedures in following research projects the characteristics of the cells which were transfected with the shRNA construct have been assessed in first experiments. Furthermore the effect of a knockdown of *c-myc* on the expression of *Pax3* has been analysed. A great part of the transfected cells remains in the lateral lip of the dermomyotome, which could be caused by a decrease of proliferation of these cells. Another reason is the down regulation of the expression of *Pax3* which leads to a decreased expression of *c-met* and *Lbx1*. The other part of the transfected cells migrates the same distance into the limb bud as in control embryos in order to form the premuscle masses. This migration could be a result of motility of these cells caused by CXCR4/SDF1 and of an expression of *c-met* on a low level.

6. Literaturverzeichnis

Amati, B. (2001). Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell-cycle control. *Nat Cell Biol* 3, E112-3.

Amati, B. and Land, H. (1994). Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 102–108.

Ayer, D.E., Kretzner, L. and Eisenman, R.N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211–222.

Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A. and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768–771.

Bonafede, A., Köhler, T., Rodriguez-Niedenführ, M. and Brand-Saberi, B. (2006). BMPs restrict the position of premuscle masses in the limb buds by influencing Tcf4 expression. *Dev. Biol.* 299, 330–344.

Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M. and Lüscher, B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 15, 2042–2047.

Brand-Saberi, B., Müller, T.S., Wilting, J., Christ, B. and Birchmeier, C. (1996). Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo. *Dev. Biol.* 179, 303–308.

Brohmann, H., Jagla, K. and Birchmeier, C. (2000). The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development* 127, 437–445.

Bull, J.J., Müller-Röver, S., Patel, S.V., Chronnell, C.M., McKay, I.A. and Philpott, M.P. (2001). Contrasting localization of c-Myc with other Myc superfamily transcription factors in the human hair follicle and during the hair growth cycle. *J Invest Dermatol* 116, 617–622.

Cappellen, D., Schlange, T., Bauer, M., Maurer, F. and Hynes, N.E. (2007). Novel c-MYC target genes mediate differential effects on cell proliferation and migration. *EMBO Rep* 8, 70–76.

Christ, B. and Brand-Saberi, B. (2002). Limb muscle development. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 905–914.

Christ, B., Jacob, H.J. and Jacob, M. (1977). Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat. Embryol.* 150, 171–186.

Cole, M.D. and Cowling, V.H. (2008). Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 810–815.

Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N.

and Golub, T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3260–3265.

Cowling, V.H. and Cole, M.D. (2006). Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin. Cancer Biol.* 16, 242–252.

Dai, F., Yusuf, F., Farjah, G.H. and Brand-Saberi, B. (2005). RNAi-induced targeted silencing of developmental control genes during chicken embryogenesis. *Dev. Biol.* 285, 80–90.

Dang, C.V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19, 1–11.

DePinho, R.A., Schreiber-Agus, N. and Alt, F.W. (1991). myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 57, 1–46.

Dietrich, S. (1999). Regulation of hypaxial muscle development. *Cell Tissue Res.* 296, 175–182.

Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Bladt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B. and Birchmeier, C. (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development* 126, 1621–1629.

Doench, J.G., Petersen, C.P. and Sharp, P.A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 17, 438–442.

Eggert, C. and Fischer U. (2003). RNA-Interferenz Ein neues Werkzeug zur Analyse der Genfunktion. *Biospektrum* 9, 372–374.

Epstein, J.A., Shapiro, D.N., Cheng, J., Lam, P.Y. and Maas, R.L. (1996). Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4213–4218.

Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A. and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17, 1115–1129.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.

Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F. and Tyner, A.L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4510–4515.

Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N. and White, R.J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 421, 290–294.

Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z.A., Ngouenet, C., Galloway,

- D.A., Eisenman, R.N. and White, R.J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat. Cell Biol.* 7, 311–318.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G. and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, 23–34.
- Gros, J., Scaal, M. and Marcelle, C. (2004). A two-step mechanism for myotome formation in chick. *Dev. Cell* 6, 875–882.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev. Dyn.* 195, 231–272.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. and Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146–1150.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* 418, 244–251.
- Harris, R.G., White, E., Phillips, E.S. and Lillycrop, K.A. (2002). The expression of the developmentally regulated proto-oncogene Pax-3 is modulated by N-Myc. *J Biol Chem* 277, 34815–34825.
- Henriksson, M. and Lüscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68, 109–182.
- Heymann, S., Koudrova, M., Arnold, H., Köster, M. and Braun, T. (1996). Regulation and function of SF/HGF during migration of limb muscle precursor cells in chicken. *Dev. Biol.* 180, 566–578.
- Iritani, B.M. and Eisenman, R.N. (1999). c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13180–13185.
- Jaffredo, T., Vandenbunder, B. and Dieterlen-Lièvre, F. (1989). In situ study of c-myc protein expression during avian development. *Development* 105, 679–695.
- Jagla, K., Dollé, P., Mattei, M.G., Jagla, T., Schuhbaur, B., Dretzen, G., Bellard, F. and Bellard, M. (1996). Mouse Lbx1 and human LBX1 define a novel mammalian homeobox gene family related to the *Drosophila* lady bird genes. *Mech. Dev.* 53, 345–356.
- Kim, S., Li, Q., Dang, C.V. and Lee, L.A. (2000). Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11198–11202.

- Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y. and Iavarone, A. (2000). Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* 407, 592–598.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O. and Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Maina, F., Casagrande, F., Audero, E., Simeone, A., Comoglio, P.M., Klein, R. and Ponzetto, C. (1996). Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 87, 531–542.
- Mateyak, M.K., Obaya, A.J., Adachi, S. and Sedivy, J.M. (1997). Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* 8, 1039–1048.
- McMahon, S.B., Wood, M.A. and Cole, M.D. (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol. Cell. Biol.* 20, 556–562.
- Mennerich, D. and Braun, T. (2001). Activation of myogenesis by the homeobox gene Lbx1 requires cell proliferation. *EMBO J.* 20, 7174–7183.
- Mennerich, D., Schäfer, K. and Braun, T. (1998). Pax-3 is necessary but not sufficient for lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mech Dev* 73, 147–158.
- Miner, J.H. and Wold, B.J. (1991). c-myc inhibition of MyoD and myogenin-initiated myogenic differentiation. *Mol Cell Biol* 11, 2842–2851.
- Morgenbesser, S.D. and DePinho, R.A. (1994). Use of transgenic mice to study myc family gene function in normal mammalian development and in cancer. *Semin Cancer Biol* 5, 21–36.
- Murdoch, C. (2000). CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol. Rev.* 177, 175–184.
- Olivera-Martinez, I., Missier, S., Fraboulet, S., Thélu, J. and Dhouailly, D. (2002). Differential regulation of the chick dorsal thoracic dermal progenitors from the medial dermomyotome. *Development* 129, 4763–4772.
- Patel, K., Christ, B. and Stockdale, F.E. (2002). Control of muscle size during embryonic, fetal, and adult life. *Results and problems in cell differentiation* 38, 163–186.
- Peters, L. and Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell* 26, 611–623.
- Piedra, M.E., Delgado, M.D., Ros, M.A. and León, J. (2002). c-Myc overexpression increases cell size and impairs cartilage differentiation during chick limb development. *Cell Growth Differ.* 13, 185–193.

- Plasterk, R.H.A. (2002). RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 296, 1263–1265.
- Rehimi, R., Khalida, N., Yusuf, F., Dai, F., Morosan-Puopolo, G. and Brand-Saberi, B. (2008). Stromal-derived factor-1 (SDF-1) expression during early chick development. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 87–92.
- Ros, M.A., Dolores Delgado, M. and Leon, J. (1995). Lack of correlation between c-myc expression and programmed or experimentally-induced cell death during chick limb development. *Int J Dev Biol* 39, 1021–1026.
- Sawai, S., Kato, K., Wakamatsu, Y. and Kondoh, H. (1990). Organization and expression of the chicken N-myc gene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2017–2026.
- Scaal, M., Bonafede, A., Dathe, V., Sachs, M., Cann, G., Christ, B. and Brand-Saberi, B. (1999). SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development. *Development* 126, 4885–4893.
- Schäfer, K. and Braun, T. (1999). Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene *Lbx1h*. *Nat. Genet.* 23, 213–216.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Hölzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A. and Weidle, U.H., et al. (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397–406.
- Schwarz, D.S. and Zamore, P.D. (2002). Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes Dev.* 16, 1025–1031.
- Sheiness, D. and Bishop, J.M. (1979). DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol* 31, 514–521.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501–1512.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Möröy, T., Bartek, J., Massagué, J. and Hänel, F., et al. (2001). Repression of p15^{INK4b} expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3, 392–399.
- Tuschl, T. (2002). Expanding small RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 20, 446–448.
- Vasyutina, E., Stebler, J., Brand-Saberi, B., Schulz, S., Raz, E. and Birchmeier, C. (2005). CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev.* 19, 2187–2198.
- Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J. and Bishop, J.M. (1982). Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* 42, 773–779.
- Webb, S.E., Lee, K.K., Tang, M.K. and Ede, D.A. (1997). Fibroblast growth factors

2 and 4 stimulate migration of mouse embryonic limb myogenic cells. *Dev. Dyn.* 209, 206–216.

Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.

Wierstra, I. and Alves, J. (2008). The c-myc promoter: still MysterY and challenge. *Adv Cancer Res* 99, 113–333.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016.

Yusuf, F. and Brand-Saberi, B. (2006). The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite. *Anat. Embryol.* 211 Suppl 1, 21–30.

Yusuf, F., Rehim, R., Dai, F. and Brand-Saberi, B. (2005). Expression of chemokine receptor CXCR4 during chick embryo development. *Anat. Embryol.* 210, 35–41.

Yusuf, F., Rehim, R., Moroşan-Puopolo, G., Dai, F., Zhang, X. and Brand-Saberi, B. (2006). Inhibitors of CXCR4 affect the migration and fate of CXCR4+ progenitors in the developing limb of chick embryos. *Dev. Dyn.* 235, 3007–3015.

7. Anhang

7.1 Stadienbestimmung der Embryonen nach Hamburger und Hamilton

Stadien der Embryonalentwicklung beim Huhn nach Hamburger&Hamilton und zugehörige Inkubationszeiten

Lagerung bei 4°C. Aufwärmzeit von ca. 2 Stunden berücksichtigen!

Stadium Inkubation Hauptmerkmale (Röm. Ziffern: Kiemenspalten)

Präsomitische Stadien

32 Zellen	0	h	Beginn der Bebrütung
HH 1	0	h	Embryonalschild, Stadium vor dem Primitivstreifen
HH 2	6 – 7	h	Beginnender Primitivstreifen
HH 3	12 – 13	h	Wachsender Primitivstreifen
HH 4	18 – 19	h	Definitiver Primitivstreifen, Hensenscher Knoten
HH 5	19 – 22	h	Fortsatz kranial des Hensenschen Knoten, Chorda sichtbar
HH 6	23 – 25	h	Einfaltung des präaxialen Ekto- und Entoderms: "Head Fold"

Somitische Stadien

HH 7	23 – 26	h	1 Somitenpaar (folgend je Paare gemeint!)
HH 8	26 – 29	h	4 Somiten, Blutinseln
HH 9	29 – 33	h	7 Somiten, Augenbläschen
HH 10	33 – 38	h	10 Somiten, 3 Hirnbläschen
HH 11	40 – 45	h	13 Somiten, 5 Neuromere
HH 12	45 – 49	h	16 Somiten, Kopf gerade, Ohrplacode
HH 13	48 – 52	h	19 Somiten, Kopf leicht gedreht, Amnion bis Rhombenz.
HH 14	50 – 53	h	22 Somiten, Kopf ganz gedreht, Hypophyse, I/II

Stadien mit Kennzeichnung durch Externe Strukturen

HH 15	50 – 55	h	24 – 27 Somiten, spitzer Winkel zw. Tel- u. Dienz., III
HH 16	51 – 56	h	26 – 28 Somiten, Amnion bis 10 – 18 Somit
HH 17	52 – 64	h	29 – 32 Somiten, Extremitätenwülste, Epiphyse
HH 18	3	d	30 – 36 Somiten, Amnion (fast) geschlossen
HH 19	3 – 3½	d	37 – 40 Somiten, Augen unpigmentiert, IV
HH 20	3 – 3½	d	40 – 43 Somiten, Allantoisblase, Extr.: L:B = 1½:1
HH 21	3½	d	43 – 44 Somiten, ventrale Krümmung von Schwanz bis lumbo-sacral
HH 22	3½ – 4	d	Somiten bis zur Schwanzspitze, Allantois erreicht Kopf
HH 23	4	d	Embryo von Nachhirn bis Schwanz ventral gekrümmt, Extr.: L:B = 1:1
HH 24	4½	d	Extr. länger als breit, Zehen nicht demarkiert
HH 25	4½ – 5	d	Ellenbogen und Knie erkennbar, Fingerplatte - ohne Fingerdemarkationen
HH 26	5	d	2./3.Finger, 1./2./3.Zehe demarkiert, III/IV verschwunden
HH 27	5 – 5½	d	1./2./3.Finger demarkiert, 3.Zehe ohne Spitze, Schnabel beinahe sichtbar
HH 28	5½ – 6	d	2.Finger u. 3.Zehe länger 4.Zehe, Schnabelansatz im Profil sichtbar
HH 29	6 – 6½	d	Ellenbogen gebeugt, 5.Zehe (Rudiment), kein Eizahn
HH 30	6½ – 7	d	Knie gebogen, Federbälge thorakal, Eizahn, 2 Skleralpapillen
HH 31	7 – 7½	d	Federbälge lumbosakral, eine Reihe je lateral am Schwanz
HH 32	7½	d	5.Zehe weg, Gewebe zw.Fingern u. Zehen dünn und konkav, 6-8 Skleralpapillen
HH 33	7½ – 8	d	13 Skleralpapillen, eine fehlt noch zum Ring
HH 34	8	d	13-14 Skleralpapillen, Nickhaut ½ Weg dorthin
HH 35	8½ – 9	d	Finger u. Zehen fertig, Nickhaut bis äußerer Rand d. Skleralpapillen
HH 36	10	d	Krallenansätze an Zehen u. 1.Finger, Nickhaut u. Unterlid bis zur Cornea
HH 37	11	d	Krallen ventr. gebogen, sternal 5-6 Reihen Federbälge, Oberlid bis Cornea
HH 38	12	d	Federbälge am Ohr u. Oberlid, Unterlid bis ¾ Cornea
HH 39	13	d	Augenöffnung zu kleinem Spalt reduziert
HH 40	14	d	Schnabel 4mm
HH 41	15	d	Schnabel 4.5mm
HH 42	16	d	Schnabel 4.8mm
HH 43	17	d	Schnabel 5.0mm
HH 44	18	d	Schnabel 5.7mm, Schnabelüberzug beginnt sich von proximal abzuschälen
HH 45	19 – 20	d	Dottersack zur Hälfte in der Leibeshöhle, CAM klebrig
HH 46	20 – 21	d	Frisch geschlüpftes Küken

Tab. 4 Stadien der Embryonalentwicklung (Tab. nach Hamburger und Hamilton, 1992).

7.2 Abbildungen der Vektoren

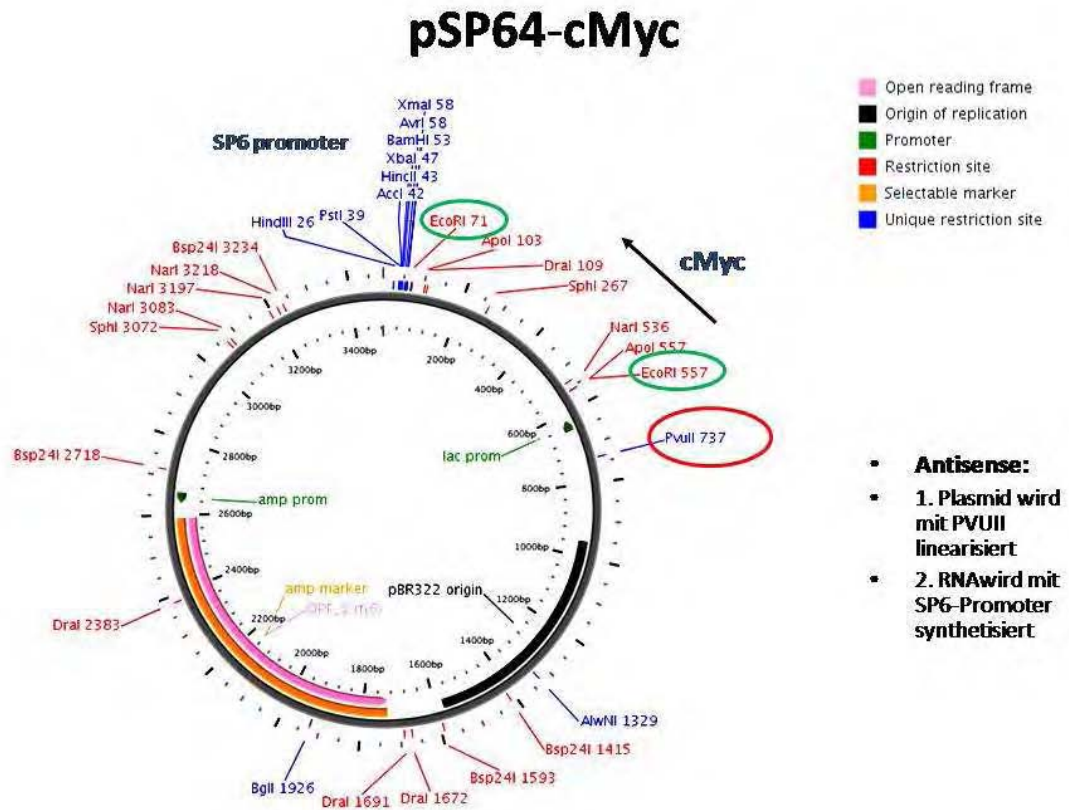


Abb. 27 pSP64 Vektor mit Insert

Zu sehen ist hier der pSP64 Vektor mit der *c-myc*-Sonde zwischen der EcoRI 71- und der EcoRI 557-Schnittstelle (grün markiert) und die PVUII-Schnittstelle (rot markiert). Nach der Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease PVUII entsteht ein Insert, bestehend aus der *c-myc*-Sonde und einem Reststück, welches von der EcoRI 557-Schnittstelle bis zur PVUII-Schnittstelle reicht.

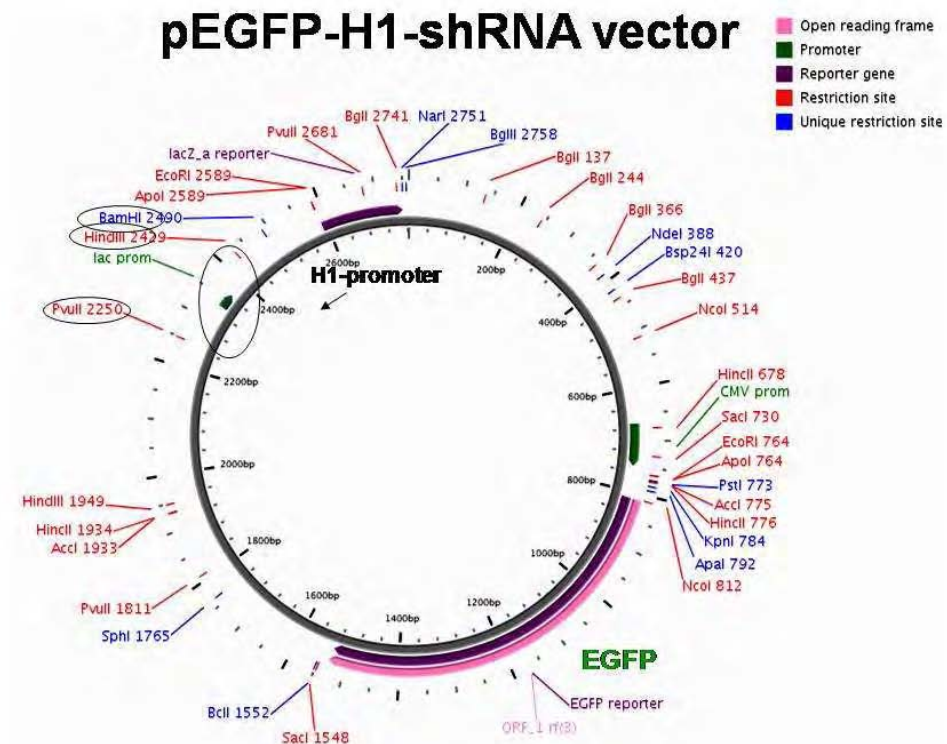


Abb. 28 shRNA Vektor mit Insert

Abgebildet ist hier der shRNA Vektor. Das Insert befindet sich zwischen der HindIII- und BamHI-Schnittstelle. Zu einer Bindung des linearisierten Insert des pSP64 Vektors kommt es zwischen der PVUII- und der HindIII-Schnittstelle.

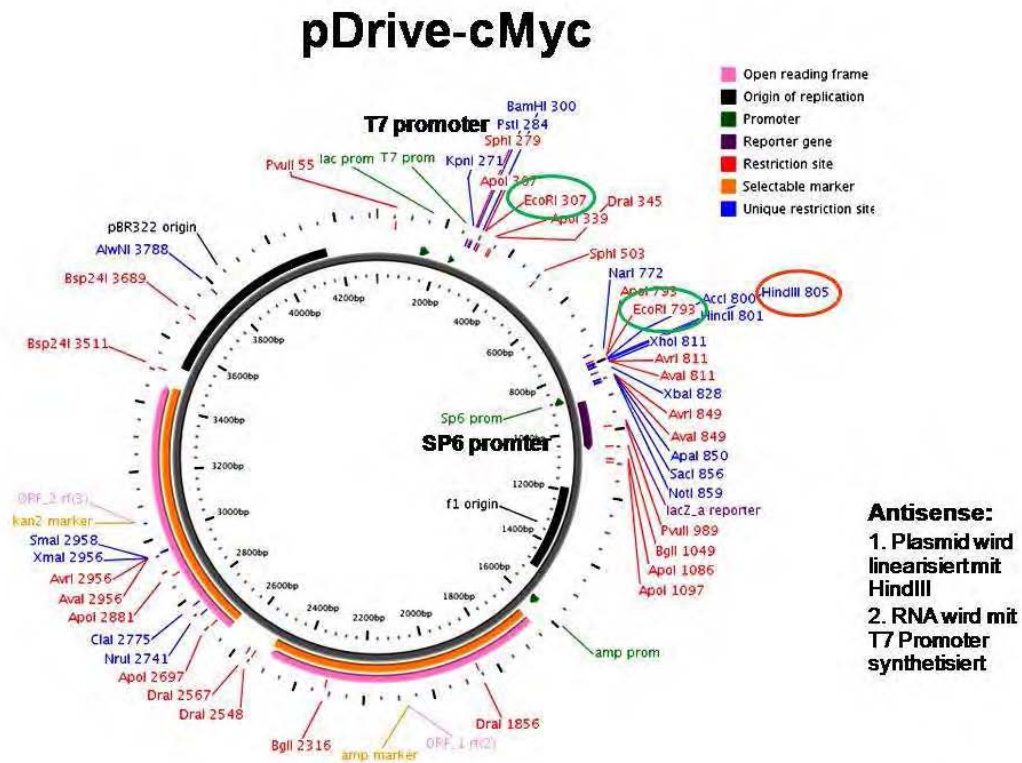


Abb. 29 pDrive Vektor mit Insert

Zu sehen ist hier der pDrive Vektor mit der *c-myc*-Sonde zwischen der EcoRI 307- und der EcoRI 793-Schnittstelle (grün markiert) und die HindIII-Schnittstelle (rot markiert). Nach der Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease HindIII entsteht ein Insert, bestehend aus der *c-myc*-Sonde und einem Reststück, welches von der EcoRI 793-Schnittstelle bis zur HindIII-Schnittstelle reicht.

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Die Struktur des c-myc Gens	2
Abb. 2 Das Myc-Protein (Abbildung nach Dang, 1999)	3
Abb. 3 Die Rolle von Myc in der Zellzyklus-Regulation.....	6
Abb. 4 Strategien zur RNA-Interferenztechnik (nach Eggert und Fischer, 2003).....	12
Abb. 5 pSP64 Poly(A) Vektor	29
Abb. 6 pDrive Vektor	30
Abb. 7 pEGFP-H1-shRNA Vektor und pEGFP-U6-shRNA Vektor (nach Dai et al., 2005).....	34
Abb. 8 a) Restriktionslängenanalyse der Plasmide für c-myc	38
Abb. 8 b) Restriktionslängenanalyse zur Absicherung der in Abb. 7 a) ausgewählten Klone von c-myc	39
Abb. 9 Ablauf der Elektroporation	43
Abb. 10 Expressionsmuster im Stadium HH 17	59
Abb. 11 Expressions-muster im Stadium HH 18.....	60
Abb. 12 Expressions-muster im Stadium HH 20.....	61
Abb. 13 a) Expressionsmuster im Stadium HH 22	62
Abb. 13 b) Expressionsmuster im Stadium HH 22 und HH 23	63
Abb. 14 Expressionsmuster im Stadium HH 25	64
Abb. 15 Expressionsmuster im Stadium HH 27	65
Abb. 16 a) Expressionsmuster im Stadium HH 29	65
Abb. 16 b) Expressionsmuster im Stadium HH 29.....	66
Abb. 17 Expressionsmuster im Stadium HH 30	67
Abb. 18 In-Situ Hybridisierung mit dem pDrive Vektor nach Transfektion mit dem scrambled shRNA Vektor (Negativkontrolle).....	69
Abb. 19 In-Situ Hybridisierung mit dem pSP64 Vektor nach Transfektion mit den Plasmiden H1 677 und H1 1374.....	70
Abb. 20 In-Situ Hybridisierung mit dem pDrive Vektor nach Transfektion mit den Plasmiden H1 677 und H1 1374.....	71
Abb. 21 Migrationsverhalten der Prämyoblasten nach Transfektion mit dem Knockdownkonstrukt	72
Abb. 22 Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Tab. 3.....	73

Abb. 23 Migrationsverhalten der Prämyoblasten nach Elektroporation mit dem Knockdownkonstrukt und Fluoreszenz-Immunhistochemie	75
Abb. 24 Migrationsverhalten der Prämyoblasten nach Elektroporation mit scrambled shRNA (Negativkontrolle) und Fluoreszenz-Immunhistochemie.....	75
Abb. 25 In-Situ Hybridisierung mit der Pax3-Sonde nach Transfektion mit den Plasmiden H1 677 und H1 1374.....	76
Abb. 26 Expressionsmuster von Pax3 und Lbx1	79
Abb. 27 pSP64 Vektor mit Insert.....	96
Abb. 28 shRNA Vektor mit Insert	97
Abb. 29 pDrive Vektor mit Insert	98

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Konzentrationen der Plasmide.....	40
Tab. 2 Migrationsverhalten der Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe nach Transfektion mit den Plasmiden H1 677 und H1 1374.	73
Tab. 3 Migrationsverhalten der Prämyoblasten aus der lateralen Dermomyotomlippe nach Transfektion mit dem scrambled shRNA Vektor (Negativkontrolle).	74
Tab. 4 Stadien der Embryonalentwicklung (Tab. nach Hamburger und Hamilton, 1992).....	95

8. Danksagung

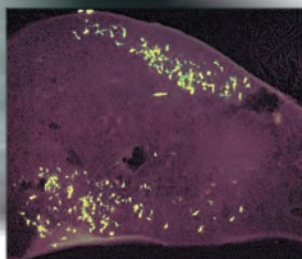
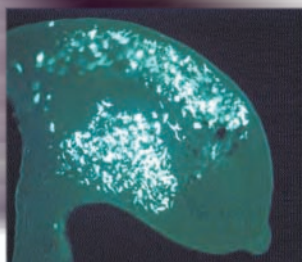
Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Bergmann für die Betreuung dieser extern angefertigten Doktorarbeit.

Ich danke Frau Prof. Dr. Beate Brand-Saberi für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe diese Arbeit durchführen zu können und für ihre Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich Rizwan Rehim und Gabriela Morosan-Puopolo für ihre Hilfe bei Fragen aller Art danken.

Für die technische Unterstützung möchte ich mich ganz besonders bei Ulrike Pein und Philipp Menzel bedanken.

Zum Schluss möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe für ihre Kollegialität, Ratschläge und Tipps danken.



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5423-7



9 783835 195423

